

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik IV der  
Ludwig-Maximilians-Universität München  
Direktor: Prof. Dr. med. M. Reincke

**Chemoimmuntherapie des Pankreaskarzinoms:  
Kombination aus bifunktioneller 5´-Triphosphat-modifizierter siRNA gegen  
TGF $\beta$ <sub>1</sub> und den Chemotherapeutika Gemcitabin, Oxaliplatin und  
5-Fluoruracil**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Mareike R. Stieg  
aus Langenfeld  
2014

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Max Schnurr

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Rudolf Wank  
Prof. Dr. Joerg Hasford

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: Dr. rer. nat. Sabine Hoves

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR,  
FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 10.07.2014



Meiner Familie

---

## Inhaltsverzeichnis

---

<b>1. Einleitung</b>	1
1.1. Das Pankreaskarzinom	1
1.1.1. Epidemiologie und Risikofaktoren	1
1.1.2. Karzinogenese	1
1.1.3. Immunologisches Tumor-Mikromilieu	2
1.1.4. Therapiestandard	3
1.2. Tumormmunologie	4
1.2.1. Hypothese des „ <i>cancer immunoediting</i> “	4
1.2.2. Immunsuppressive Mechanismen im Pankreaskarzinom	6
1.3. Immuntherapie des Pankreaskarzinoms	7
1.3.1. Klinische Studien und neue Therapieansätze	7
1.3.2. <i>RIG-I-like</i> Helikasen	9
1.3.3. Bifunktionelle 5'ppp-siRNA gegen TGF $\beta$ <sub>1</sub>	10
1.3.4. Einfluss von Chemotherapeutika auf Immunzellen	12
1.3.5. Chemoimmuntherapie	13
1.4. Zielsetzung dieser Arbeit	13
<b>2. Material und Methoden</b>	14
2.1. Zellbiologische Methoden	14
2.1.1. Zellkultur	14
2.1.2. Zelllinien	15
2.1.2.1. Murine Zelllinien	15
2.1.2.2. Humane Zelllinien	15
2.1.3. Stimulation mit Interferon- $\alpha$	16
2.1.4. <i>Small interfering</i> RNA	16
2.1.5. <i>In Vitro</i> - Transfektion	16
2.1.6. Behandlung mit Zytostatika	17
2.1.7. Funktionelle Analysen	18
2.1.7.1. ELISA zum Nachweis von CXCL10 (IP-10)	18
2.1.7.2. Durchflusszytometrische Analyse zum Nachweis von MHC-I	18
2.1.7.3. Bestimmung der Zellviabilität	18
2.1.7.5. Apoptosebestimmung mittels Annexin V und Propidiumjodid	19
2.2. Molekularbiologische Methoden	20
2.2.1. <i>In vitro</i> -Transkription	20
2.2.2. Isolierung und Quantifizierung von Zellkultur-RNA	21
2.2.3. Reverse Transkription	22
2.2.4. Quantitative <i>RealTime</i> -PCR	22
2.2.5. PCR von humanem RIG-I	24
2.2.6. Immunfluoreszenz	25
2.3. Syngenes Panc02-Tumormodell	25
2.3.1. Versuchstiere und Haltung	25
2.3.2. Tumorinduktion	26

## Inhaltsverzeichnis

---

2.3.3. Tumorthherapie .....	27
2.3.3.1. Chemotherapie <i>in vivo</i> .....	27
2.3.3.2. <i>In vivo</i> -Injektion von ppp-siRNA .....	27
2.3.3.3. Chemoimmuntherapie <i>in vivo</i> .....	28
2.3.4. Funktionelle Analysen .....	28
2.3.4.1. Zytokinbestimmung aus Serum.....	28
2.3.4.2. Durchflusszytometrie .....	29
2.4. Statistische Analysen .....	29
<b>3. Ergebnisse</b> .....	30
3.1. <i>In vitro</i> Untersuchungen zur Chemoimmuntherapie im murinen Pankreaskarzinommodell	30
3.1.1. Regulation der RIG-I-Expression .....	30
3.1.2. Behandlung von Panc02 Zellen mit bifunktioneller 5' ppp-RNA gegen TGF $\beta$ <sub>1</sub> .....	30
3.1.2.1. Genexpressionshemmung von TGF $\beta$ <sub>1</sub> .....	30
3.1.2.2. Immunstimulation durch ppp-mTGF $\beta$ .....	31
3.1.2.3. Zeit- und Dosisabhängigkeit der Apoptoseinduktion durch ppp-mTGF $\beta$ .....	32
3.1.3. Sensitivität gegenüber Chemotherapeutika .....	34
3.1.4. Apoptoseinduktion durch die kombinierte Chemoimmuntherapie.....	34
3.1.5. Mechanismus der verstärkten Apoptoserate durch Gemcitabinbehandlung .....	39
3.1.5.1. Expression von RIG-I nach Behandlung mit ppp-mTGF $\beta$ oder Chemotherapie .....	40
3.1.5.2. Expression der pro-apoptotischen Moleküle Puma und Noxa durch Transfektion mit ppp-mTGF $\beta$ .....	41
3.1.5.3. Expression der pro-apoptotischen Moleküle Puma und Noxa durch Behandlung mit Chemotherapeutika .....	42
3.2. RNA-basierte Chemoimmuntherapie im Panc02 Mausmodell.....	44
3.2.1. Chemoimmuntherapie im subkutanen Panc02 Mausmodell.....	44
3.2.2. Dosisfindung von Gemcitabin <i>in vivo</i> .....	46
3.2.3. Chemoimmuntherapie im orthotopen Panc02 Modell.....	46
3.2.3.1. Analyse der Lymphozyten im peripheren Blut.....	48
3.2.3.2. Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen.....	54
3.2.3.3. Einfluss der Therapie auf die TGF $\beta$ <sub>1</sub> Serumspiegel .....	55
3.3. RNA-basierte Chemoimmuntherapie humaner Pankreaskarzinomzelllinien .....	56
3.3.1. RIG-I Expression in humanen Pankreaskarzinomlinien.....	56
3.3.2. Einfluss von 5'-modifizierter siRNA gegen TGF $\beta$ <sub>1</sub> auf humane Pankreaskarzinomzellen .....	57
3.3.2.1. Expressionshemmung von humanem TGF $\beta$ <sub>1</sub> .....	57
3.3.2.2. Immunaktivierende Effekte von ppp-hTGF $\beta$ auf humane Pankreaskarzinomzelllinien ..	58
3.3.2.2.1. Regulation der MHC Klasse I Expression .....	58
3.3.2.2.2. Induktion proinflammatorischer Zytokine und Chemokine .....	59
3.3.2.3. Zeit- und Dosisabhängigkeit der Apoptoseinduktion durch Therapie mit ppp-hTGF $\beta$ ...	60
3.3.3. Sensitivität gegenüber Chemotherapeutika .....	62
3.3.4. Apoptoseinduktion durch Chemoimmuntherapie in PANC-1 und Suit007 Zellen.....	63

## Inhaltsverzeichnis

---

3.3.5. Mechanismus der verstärkten Apoptoserate durch Gemcitabinbehandlung in humanen Pankreaskarzinomzellen .....	65
3.3.5.1. Einfluss von ppp-hTGF $\beta$ und Chemotherapie auf die RIG-I Expression .....	65
3.3.5.2. Induktion pro-apoptotischer Moleküle durch Chemotherapie bzw. ppp-hTGF in humanen Tumorzelllinien .....	67
<b>4. Diskussion</b> .....	71
4.1. RLH als molekulare Zielstrukturen einer Tumormimmuntherapie.....	71
4.2. RIG-I Aktivierung durch ppp-TGF $\beta$ .....	72
4.3. TGF $\beta_1$ Expressions-hemmende Funktion von ppp-TGF $\beta$ .....	73
4.4. Induktion von Apoptose durch ppp-TGF $\beta$ .....	74
4.5. <i>In vitro</i> Sensitivität diverser Pankreaskarzinomlinien auf Zytostatika .....	76
4.6. Effekte der Chemoimmuntherapie auf Tumorzell-Apoptose .....	77
4.7. Rolle pro-apoptotischer Moleküle im intrinsischen Apoptoseweg .....	78
4.8. Gemcitabin- und ppp-TGF $\beta$ -basierte Chemoimmuntherapie im Panc02 Tumormodell <i>in vivo</i> .....	80
4.9. Zusammenfassende Bewertung der Ergebnisse und Ausblick.....	82
<b>5. Zusammenfassung</b> .....	85
<b>6. Literaturverzeichnis</b> .....	86
<b>7. Verzeichnis der Abkürzungen</b> .....	94
<b>8. Anhang</b> .....	97
8.1. Expression von RIG-I und MDA5 in verschiedenen murinen und humanen Pankreaskarzinomzelllinien.....	97
8.2. Sensitivität humaner Pankreaskarzinomzelllinien gegenüber Chemotherapie.....	98
<b>9. Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen</b> .....	99
<b>10. Danksagung</b> .....	102
<b>11. Veröffentlichungen</b> .....	103



## **1. Einleitung**

### **1.1. Das Pankreaskarzinom**

#### **1.1.1. Epidemiologie und Risikofaktoren**

Das Pankreaskarzinom ist eine äußerst aggressive Krebserkrankung der Bauchspeicheldrüse und gehört zu den vier häufigsten Ursachen tumorbedingter Todesfälle. Männer und Frauen sind etwa gleich häufig betroffen, wobei das Auftreten der Erkrankung meist im höheren Lebensalter liegt. Die Inzidenz des Pankreaskarzinoms liegt nahe der Mortalitätsrate, ein Langzeitüberleben von betroffenen Patienten ist die Ausnahme (Siegel, Naishadham et al. 2012). Die 5-Jahresüberlebensrate ist mit unter 5 Prozent die geringste aller Krebserkrankungen. In vielen Fällen wird die Diagnose oft erst in einem vorgeschrittenem Stadium gestellt, da die Patienten keine auffällige Frühsymptomatik zeigen. Ein weiteres Kennzeichen des Pankreaskarzinoms ist eine frühe lymphogene sowie hämatogene Metastasierung, wodurch eine kurative Therapie erschwert und somit die Prognose verschlechtert wird (Adler, Seufferlein et al. 2007). Zur Entstehung des Pankreaskarzinoms werden verschiedene Umwelt- und Ernährungsfaktoren diskutiert. Der häufigste Risikofaktor ist dabei das Rauchen. Alkohol stellt keinen eigenständigen Risikofaktor dar, spielt aber bei der Entstehung einer chronischen Pankreatitis eine Rolle, die wiederum zur Entstehung eines Pankreaskarzinoms beitragen kann. Des Weiteren werden Adipositas, Diabetes mellitus sowie die genetische Disposition als prädisponierende Faktoren genannt (Raimondi, Maisonneuve et al. 2009).

#### **1.1.2. Karzinogenese**

Bei den Karzinomen der Bauchspeicheldrüse handelt es sich in den meisten Fällen um Adenokarzinome, die durch maligne Entartung des exokrinen Anteils des Pankreas entstehen. Seltener finden sich zystische, azinäre oder endokrine Tumore des Pankreas. Das Pankreaskarzinom entwickelt sich nach derzeitigem Wissensstand aus prämaligen Vorstufen des Epithels im Pankreasgangsystem, aus sogenannten PanIN-Läsionen (PanIN: *pancreatic intraepithelial neoplasia*) (Hruban, Goggins et al. 2000). Während der Entwicklung von prämaligen Vorstufen zum invasiven Pankreaskarzinom finden sich bestimmte genetische Mutationen sowie epigenetische Veränderungen. Die häufigsten Mutationen betreffen die Aktivierung des Kras-Onkogens, sowie die Inaktivierung der Tumorsuppressorgene p16/CDKN2A, TP53, SMAD4 und BRCA2. Auch ein Verlust von Chromosomen, die Amplifizierung von

Genen und das Kürzen von Telomerstrukturen lassen sich beobachten (Li, Xie et al. 2004). Diese frühen, prämaligen Vorstufen finden sich bevorzugt im Pankreaskopf mit erhöhter Prävalenz im Alter, sowie im Rahmen einer chronischen Pankreatitis. Die Dauer und die Wahrscheinlichkeit einer Entwicklung zum invasiven Pankreaskarzinom ist jedoch nicht vollständig geklärt (Hruban, Maitra et al. 2008).

Nicht nur genetische Mutationen tragen zur Entstehung eines Pankreaskarzinoms bei. Auch das Tumorstroma, welches sich aus diversen nicht-malignen Zellpopulationen und Matrixproteinen zusammensetzt, spielt eine entscheidende Rolle. Beim Pankreaskarzinom kann das Tumorstroma bis zu 90% des Tumolvolumens ausmachen und besteht hauptsächlich aus aktivierten Fibroblasten, Entzündungszellen und extrazellulärer Matrix. Ein komplexes Zusammenspiel zwischen Tumorzellen und nicht-malignen Zellen führt über verschiedene Mediatoren zu einem Mikromilieu, das das Tumorwachstum fördern und des Weiteren zur Resistenzentwicklung gegen Chemotherapeutika beitragen kann (Neesse, Michl et al. 2011).

### **1.1.3. Immunologisches Tumor-Mikromilieu**

Tumorspezifische Antigene, die Tumorzellen auf ihrer Oberfläche tragen und ein gezieltes Erkennen der Tumorzellen durch das Immunsystem ermöglichen, sind für das Pankreaskarzinom nur wenige bekannt und werden teilweise auch auf nicht-malignen Zellen gefunden, wie beispielsweise CEA oder CA19-9. Es gibt jedoch auch Antigene, die spezifisch auf malignen Zellen zu finden sind und auf Grund ihres weiteren Vorkommens auf Stammzellen im Hoden *cancer testis antigens* (CTA) genannt werden (Kubuschok, Xie et al. 2004). Das Pankreaskarzinom exprimiert ein bestimmtes Spektrum dieser CTAs, was für die Entwicklung von immuntherapeutischen Strategien eine Rolle spielt (Schmitz-Winnenthal, Galindo-Escobedo et al. 2007). Darüber hinaus lassen sich im Knochenmark und im Blut der Patienten mit Pankreaskarzinom T-Zellen finden, die durch spezifische Tumorantigene aktiviert werden, was sowohl in der Diagnostik als auch in der Therapie des Pankreaskarzinoms genutzt werden könnte (Schmitz-Winnenthal, Volk et al. 2005). Ein prognostisch günstiger Faktor ist der Nachweis von T-Zellen im Tumorgewebe der Patienten (Fukunaga, Miyamoto et al. 2004). Regulatorische T-Zellen, die effektiv Immunantworten unterdrücken, scheinen hingegen einen negativen prognostischen Faktor darzustellen (Liyanage, Moore et al. 2002; Hiraoka, Onozato et al. 2006). Ebenso korrelieren Serumspiegel des immunsuppressiven Zytokins TGF $\beta$  mit einer schlechten Prognose (Friess, Yamanaka et al. 1993; Lin, Kikuchi et al. 2006), was - zusammen mit der prognostischen

Bedeutung der T-Zellen - darauf hinweist, dass dem Immunsystem bei der Bekämpfung und Kontrolle des Tumorwachstums eine Bedeutung zukommt.

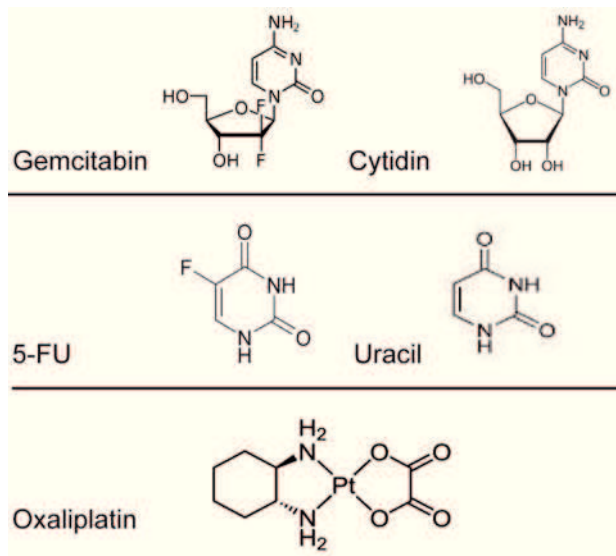
#### **1.1.4. Therapiestandard**

Der einzige kurative Ansatz in der Therapie des Pankreaskarzinoms besteht in einer operativen Radikalentfernung des Tumors, welche in Abhängigkeit von Tumorstadium, Ko-Morbidität und Patientenwunsch durchgeführt wird. Auf Grund der späten Diagnosestellung ist eine Resektion jedoch nur bei einem geringen Anteil der betroffenen Patienten durchführbar. Die 5-Jahresüberlebensrate nach Radikalresektion wird mit max. 25% angegeben (Wagner, Redaelli et al. 2004). Sowohl Lokalrezidive wie auch Fernmetastasen spielen bei den Tumorrezidiven eine Rolle. Nach R0- bzw. R1-Resektion wird deshalb eine adjuvante Chemotherapie für sechs Monate empfohlen. Protokolle für eine adjuvante Therapie basieren auf der Gabe von 5-Fluoruracil (5-FU) oder Gemcitabin, wobei letzteres den derzeitigen Standard darstellt (Adler, Seufferlein et al. 2007). Auch in der palliativen Situation hat sich das Chemotherapeutikum Gemcitabin als Standard etabliert, da es - trotz geringem Einfluss auf das Überleben - zu einer verbesserten Lebensqualität führt (Burris, Moore et al. 1997). Eine kombinierte Therapie aus Gemcitabin und Oxaliplatin kann zu einem verbesserten Tumoransprechen führen, verlängert jedoch nicht das Überleben und resultiert in stärkeren Nebenwirkungen (Louvvet, Labianca et al. 2005). Neuere Protokolle, die mehrere zytotoxische Substanzen miteinander kombinieren, wie z. B. das FOLFIRINOX Schema, können für ausgewählte Patienten mit sehr gutem Allgemeinzustand von Vorteil sein, sind jedoch mit erheblicher Toxizität verbunden (Conroy, Desseigne et al. 2011). Auch die Kombination von Gemcitabin mit Nab-Paclitaxel stellt eine neue interessante Therapiealternative dar, die zu einer signifikanten Überlebensverlängerung führt (Von Hoff, Ervin et al. 2013).

Die am häufigsten als Standardtherapie verwendeten Chemotherapeutika, die auch im Rahmen in der hier vorliegenden Arbeit untersucht werden, sind 5-FU, Gemcitabin und Oxaliplatin. Zur Gruppe der Antimetabolite gehören sowohl Gemcitabin als auch 5-FU. Gemcitabin ist ein Analogon des Nukleosids Cytidin, das als Prodrug verabreicht wird und in seiner aktiven Form Gemcitabin-Triphosphat zur Unterbrechung der DNA-Synthese führt. Über Aktivierung des Tumorsuppressors p53 kommt es zum Zellzyklusarrest und zur Apoptoseinduktion. 5-FU ist ein Analogon der Base Uracil, führt somit ebenfalls als Pyrimidinanalogon zur Unterbrechung der DNA-Synthese und hemmt darüber hinaus die Thymidylat-Synthase. Zur Gruppe der Platinderivate zählt

## Einleitung

Oxaliplatin, welches zu Quervernetzungen innerhalb und zwischen den DNA-Strängen führt.



**Abbildung 1:  
Strukturformeln der  
Chemotherapeutika und  
physiologische Korrelate**

Links die Antimetaboliten 5-FU und Gemcitabin mit ihren strukturverwandten Nukleosiden (rechts). Unten das Platinderivat Oxaliplatin.

Trotz dieser bekannten antiproliferativen Eigenschaften der Chemotherapeutika ist der Therapieerfolg durch eine ausgeprägte Chemoresistenz der Pankreaskarzinomzellen limitiert. Diese Resistenz beruht auf verschiedenen Einflüssen, wie einer verminderten Aufnahme und/oder Aktivierung der Chemotherapeutika, Mutationen in Genen der Zellzyklus- und Apoptoseregulation, sowie dem Einfluss des Tumorstromas (Sheikh, Walsh et al. 2010).

## 1.2. Tumorummunologie

### 1.2.1. Hypothese des „cancer immunoediting“

Tumorzellen unterscheiden sich im Vergleich zu gesunden Körperzellen durch verschiedene zusätzliche Eigenschaften, die sie durch Mutationen erworben haben. Hanahan et al. beschrieben diese charakteristischen Eigenschaften als die folgenden sechs *hallmarks of cancer*: Unabhängigkeit von Wachstumssignalen, Unempfindlichkeit gegenüber antiproliferativen Signalen, unbegrenztes Wachstumspotential, Umgehen von Apoptose, Fähigkeit zur Induktion von Angiogenese, sowie die Fähigkeit zur Invasion und Metastasenbildung (Hanahan and Weinberg 2011).

Bei der Entstehung von Tumorerkrankungen spielt das Immunsystem eine duale Rolle. Auf der einen Seite hat das Immunsystem Möglichkeiten die Entstehung von Tumorerkrankungen zu verhindern. Virus-induzierte Tumore können beispielsweise durch Bekämpfen von Virusinfektionen verhindert werden. Pathogene können eliminiert werden, so dass kein entzündliches Milieu entsteht, welches zur Tumorgenese

## Einleitung

---

beitragen kann. Des Weiteren ist das Immunsystem in der Lage, Tumorzellen anhand von Tumor-spezifischen Antigenen zu erkennen und so gezielt zu eliminieren (Vesely, Kershaw et al. 2011). Auf der anderen Seite trägt das Immunsystem dazu bei, die Tumorgenese zu formen und zu fördern. Die zweiseitige Rolle des Immunsystems wird als „*cancer immunoediting*“ beschrieben und besteht aus drei Prozessen (Dunn, Old et al. 2004): Eliminierung, Equilibrium und Entkommen (*immune escape*).

Die erste Phase ist die sogenannte Eliminierung. Zellen des angeborenen Immunsystems, wie beispielsweise natürliche Killerzellen (NK-Zellen), Makrophagen oder dendritische Zellen (DC) werden durch das Mikromilieu des Tumors rekrutiert und stimulieren nach Aktivierung die Produktion von Interferon- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) und weiteren Chemokinen wie etwa CXCL10. Dieser entzündliche Prozess führt unter anderem zu Tumorzelltod sowie zur Aktivierung von tumorspezifischen T-Zellen im drainierenden Lymphknoten. Die Zellen des erworbenen Immunsystems, CD4<sup>+</sup>- sowie CD8<sup>+</sup>-T-Zellen, tragen weiter zur Elimination von malignen Zellen bei (Dunn, Bruce et al. 2002). Tumorzellen, die die Phase der Eliminierung überlebt haben, unterliegen im sogenannten Equilibrium einer starken Selektion. Das Immunsystem ist während dieser Phase einerseits in der Lage, vereinzelte Tumorzellen an ihrer Proliferation zu hindern und somit ein Entstehen einer manifesten Erkrankung über einen langen Zeitraum zu verhindern. Jedoch ist dieser Prozess auch gekennzeichnet durch das Entstehen von gering immunogenen Tumorzellvarianten. Auf Grund ihrer schnellen genetischen Veränderung können Tumorzellen der Immunantwort entkommen, indem sie beispielsweise den Haupthistokompatibilitätskomplex I (*major histocompatibility complex I*, MHC-I) herunter regulieren und somit nicht von zytotoxischen T-Zellen erkannt werden. Des Weiteren kann es auch zu einer aktiven Unterdrückung der Immunantwort kommen. Hier spielen verschiedene Mediatoren, wie beispielsweise das Zytokin *transforming growth factor beta* (TGF $\beta$ ), eine Rolle (siehe 1.2.2.). Auf diese Phase folgt der so genannte *escape*. Hier kommt es zur Expansion der selektierten Tumorzellen, die sich durch weitere Mutationen der Immunantwort entzogen haben. Somit trägt die ursprünglich antitumorale Immunantwort durch Prozesse der Selektion gleichzeitig auch zur Entstehung einer manifesten Tumorerkrankung bei (Dunn, Old et al. 2004; Schreiber, Old et al. 2011).

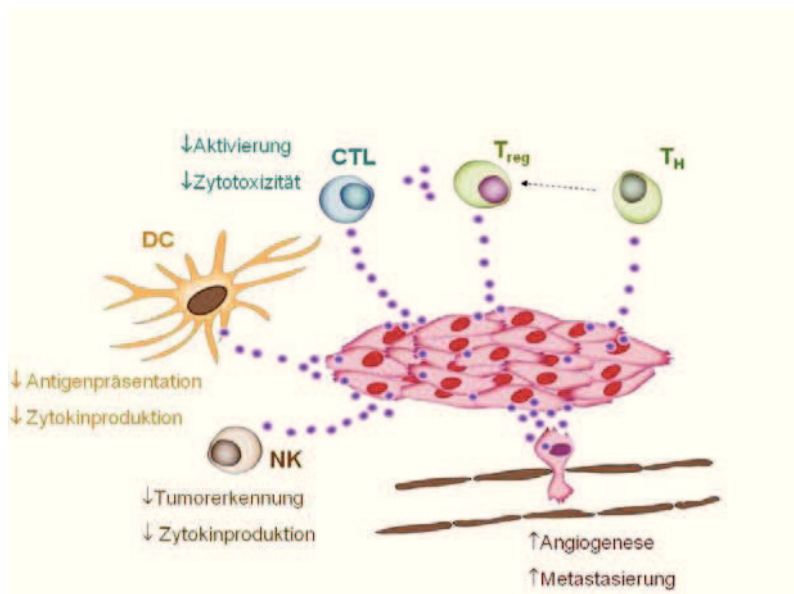
Das Entkommen vor der antitumoralen Immunantwort (*immune escape*) lässt sich somit auch als siebtes Charakteristikum von Tumorzellen bezeichnen (Dunn, Old et al. 2004; Zitvogel, Tesniere et al. 2006).

### 1.2.2. Immunsuppressive Mechanismen im Pankreaskarzinom

Das Pankreaskarzinom zeichnet sich durch eine ausgeprägte Suppression der Immunantwort aus. Immunzellen, die normalerweise an der Erkennung und Eliminierung von Tumorzellen beteiligt sind, werden z. B. unter dem Einfluss von pro-inflammatorischen Zytokinen in ihrer Funktion gehemmt, was als Immunsuppression bezeichnet wird (von Bernstorff, Voss et al. 2001). Das Unterdrücken der körpereigenen Abwehr kann durch verschiedene Mechanismen vermittelt werden. Folgende Zellpopulationen spielen dabei u. a. eine Rolle (Clark, Hingorani et al. 2007): Tumor-assoziierte Makrophagen (TAMs) werden durch hypoxische Bedingungen und ein entzündliches Milieu im Tumor angelockt und fördern die Angiogenese sowie die Invasion der Tumorzellen (Pollard 2004). *Myeloid-derived suppressor cells* (MDSC) werden durch Zytokine aus Tumorzellen, wie beispielsweise IL-10 und GM-CSF, aktiviert und unterdrücken die tumorspezifische T-Zellantwort (Serafini, Borrello et al. 2006; Bayne, Beatty et al. 2012; Pylayeva-Gupta, Lee et al. 2012). Eine weitere immunsuppressive Zellpopulation stellen die regulatorischen T-Zellen dar, deren Rekrutierung und Proliferation unter anderem durch TGF $\beta$  gefördert wird (Yang, Pang et al. 2010). Diese regulatorischen T-Zellen führen unter anderem zu einer Unterdrückung der T-Zellantwort, der sog. T-Zellanergie (Rabinovich, Gabrilovich et al. 2007). Bei Patienten mit Pankreaskarzinom finden sich typischerweise erhöhte Serumspiegel des Zytokins TGF $\beta$  (Friess, Yamanaka et al. 1993; Lin, Kikuchi et al. 2006), sowie eine Zunahme an regulatorischen T-Zellen (Liyanage, Moore et al. 2002; Hiraoka, Onozato et al. 2006), was mit einer ungünstigen Prognose korreliert.

Das Zytokin TGF $\beta$  vermittelt unter normalen Umständen vielseitige physiologische Funktionen in der Gewebshomöostase. Es reguliert die Proliferation und Differenzierung sowie Apoptose und Adhäsion von Zellen. Durch eine Dysregulation von TGF $\beta$  gelingt es Tumorzellen diese Funktionen zu missbrauchen und die proliferativen Eigenschaften zu Gunsten des Tumorwachstums, der Invasion und Metastasenbildung, sowie der Angiogenese zu nutzen (Massague 2008).

Darüber hinaus besitzt TGF $\beta$  auch direkte immunsuppressive Eigenschaften. So hemmt TGF $\beta$  die Funktion von CD8<sup>+</sup> zytotoxischen T-Zellen (CTL), dendritischen Zellen und NK-Zellen und fördert gleichzeitig die Aktivierung regulatorischer T-Zellen (Moutsopoulos, Wen et al. 2008; Yang, Pang et al. 2010). Insgesamt wird durch TGF $\beta$  also ein Mikromilieu geschaffen, das das Überleben und Wachstum der Tumorzellen begünstigt (**Abbildung 2**).



**Abbildung 2: Effekte von TGFβ auf Tumorinvasivität und Zellen des Immunsystems**

Pankreaskarzinomzellen sowie regulatorische T-Zellen sezernieren TGFβ, welches einerseits die Tumorphiliferation, Angiogenese und Metastasierung begünstigt und andererseits die anti-tumorale Immunabwehr hemmt (T<sub>reg</sub>: regulatorische T-Zellen, T<sub>H</sub>: CD4<sup>+</sup> T-Helfer-Zellen, CTL: CD8<sup>+</sup> zytotoxische T-Zellen, DC: dendritische Zellen, NK: natürliche Killerzellen).

### 1.3. Immuntherapie des Pankreaskarzinoms

#### 1.3.1. Klinische Studien und neue Therapieansätze

In der Therapie des Pankreaskarzinoms haben zielgerichtete Therapien, sog. *targeted therapies*, und immuntherapeutische Ansätze aktuell noch keinen Stellenwert (Adler, Seufferlein et al. 2007). Jedoch gibt es multiple neue Therapieansätze, die molekulare Signalkaskaden und Komponenten der Karzinogenese als therapeutische Angriffspunkte verwenden. *In vitro* und in Tiermodellen wurden beispielsweise Kras, *epidermal growth factor receptor* (EGFR) oder *vascular endothelial growth factor* (VEGF) als mögliche Ziele identifiziert. Weitere Angriffspunkte finden sich neben embryonalen Signalkaskaden in Telomerasen, microRNAs und Tumorstammzellen (Wong and Lemoine 2009). Von den genannten zielgerichteten Therapien hat Erlotinib, ein EGFR Tyrosinkinase Inhibitor, als bislang einziges Medikament einen signifikanten Überlebensvorteil in einer klinischen Phase III Studie gezeigt (Moore, Goldstein et al. 2007).

Auf Grund ihrer immunsuppressiven und Tumorstum-fördernden Eigenschaften ist auch die TGFβ-Signalkaskade ein therapeutisches Angriffsziel (Gaspar, Li et al. 2007; Pennison and Pasche 2007). Es sind sowohl Inhibitoren der TGFβ-Rezeptoren 1 und 2 in Entwicklung (Melisi, Ishiyama et al. 2008), als auch direkte Inhibitoren von

TGF $\beta$ , welche in präklinischen Studien gute Ergebnisse gezeigt haben und sich in klinischer Erprobung zur Therapie verschiedener Tumore befinden (Jaschinski, Rothhammer et al. 2011; Schlingensiepen, Jaschinski et al. 2011).

Nicht nur im Bereich der zielgerichteten Therapien, sondern auch in der Immuntherapie des Pankreaskarzinoms gibt es verschiedene erfolgversprechende Ansätze. Man unterscheidet eine passive Immunisierung mit der Gabe von Zytokinen, Interferonen oder Antikörpern von einer aktiven Immunisierung durch Tumorstoffe, die entweder aus Tumorstoffen oder rekombinant hergestelltem Tumorstoffen bestehen können (Dodson, Hawkins et al. 2011; Koido, Homma et al. 2011). Sowohl *in vitro* als auch *in vivo* konnte gezeigt werden, dass eine Vakzinierung mit Tumorstoffen in einer verbesserten Kreuzpräsentation durch DC und damit zu einer Aktivierung von tumorreaktiven CTL führt (Schnurr, Galambos et al. 2001; Maraskovsky, Sjolander et al. 2004; Schnurr, Chen et al. 2005). In einem syngenem Pankreaskarzinommodell konnte gezeigt werden, dass eine Kombination von Gemcitabin mit einer DC-Vakzine zu einem verlängerten Überleben der Tiere führt (Bauer, Bauernfeind et al. 2007). Darauf aufbauend führte unsere Arbeitsgruppe eine klinische Phase-I/II Studie durch, in der Patienten mit rezidivierendem Pankreaskarzinom mit einer autologen DC-Vakzine und Gemcitabin behandelt wurden (Bauer, Daur et al. 2011). In einer anderen präklinischen Studie unserer Arbeitsgruppe führte die Kombination einer Tumorstoffe mit einem Antikörper, der regulatorische T-Zellen depletiert, bzw. in Kombination mit einem TLR9 Liganden zu guten Therapieeffekten (Jacobs, Duewell et al. 2011). Aktuell befinden sich mehrere Vakzine zur Therapie des fortgeschrittenen Pankreaskarzinoms in klinischen Studien. Darunter zeigen Algenpantucel-L und GVAX, zwei DC-basierende Vakzine, in Kombination mit Chemotherapeutika oder Immunmodulatoren vielversprechende Ergebnisse. Weitere Angriffsziele stellen tumorspezifische Antigene wie Mucin1, Enolase, *heat shock* Proteine (HSP) sowie Telomerasen dar. Diese Peptid- bzw. DNA-basierten Vakzine befinden sich in präklinischer und klinischer Erprobung (Cappello, Rolla et al. 2013; Devito and Saif 2013; Zheng, Xue et al. 2013).

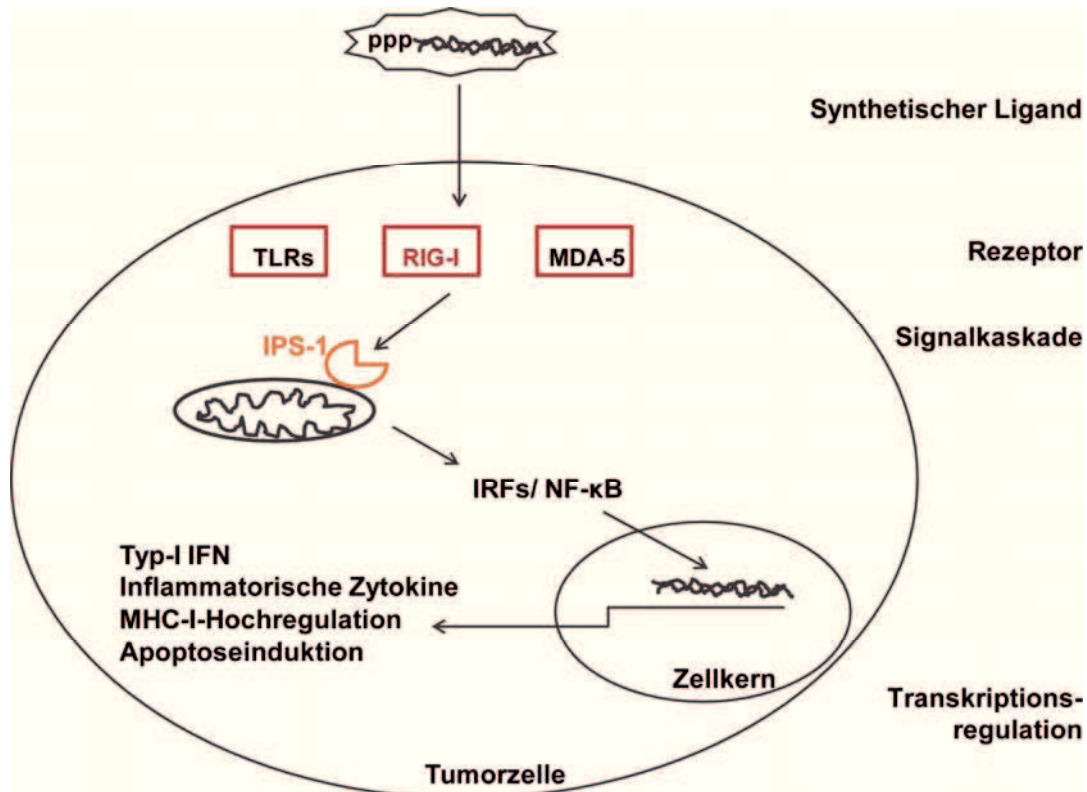
Auch wenn diese und andere präklinische und frühen klinische Studien interessante Ansätze darstellen, ist eine Durchbrechung der vom Pankreaskarzinom ausgehenden Immunsuppression weiterhin eine große Herausforderung für die Immuntherapie.



### 1.3.2. *RIG-I-like* Helikasen

Ein innovativer Ansatz zur Therapie des Pankreaskarzinoms findet sich in dem therapeutischen Einsatz von Liganden der sog. *RIG-I-like* Helikasen (RLH). Diese gehören neben den *Toll-like*-Rezeptoren (TLR) zu den zytoplasmatischen Mustererkennungsrezeptoren, die das Immunsystem befähigen zwischen pathogenen Mikroorganismen und körpereigenen Strukturen zu unterscheiden (Akira, Uematsu et al. 2006). Zur Familie der *RIG-I-like* Helikasen gehören *retinoic acid-inducible gene 1* (RIG-I) und *melanoma differentiation-associated antigen 5* (MDA5). RLH erkennen virale RNA im Zytoplasma und lösen die Ausschüttung von Typ-I Interferonen sowie eine Aktivierung des adaptiven Immunsystems aus (Takeuchi and Akira 2008; Yoneyama and Fujita 2009). Für eine therapeutische Nutzung von RLH stehen synthetische Liganden zur Verfügung. MDA5 wird durch das Doppelstrang-RNA-Analogon *polyinosinic-polycytidylic acid* (poly(I:C)) aktiviert. Die Aktivierung von RIG-I erfolgt über kurze RNA-Oligonukleotide mit einer Triphosphatmodifikation am 5'-Ende (Hornung, Ellegast et al. 2006; Pichlmair, Schulz et al. 2006). Nach Bindung dieser Liganden interagieren RIG-I und MDA5 mit ihrem Adapterprotein IPS-1 (auch als MAVS bekannt) auf der äußeren Mitochondrienmembran, worauf eine durch IRF-3, IRF-7 und NFκB-vermittelte Immunantwort mit Produktion von Typ-I Interferonen ausgelöst wird. Interferone spielen eine wichtige Rolle in der Aktivierung der angeborenen und adaptiven Immunantwort gegenüber virusinfizierten Zellen sowie Tumorzellen (Dunn, Bruce et al. 2005). Des Weiteren kommt es nach Aktivierung von RLH zur Produktion von proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen wie beispielsweise IL-6 und CXCL10, sowie zur Induktion der Expression von MHC-I Molekülen auf der Tumorzelloberfläche.

Zudem sind RLH-Liganden in der Lage, Apoptose in Tumorzellen auszulösen (Besch, Poeck et al. 2009; Tormo, Checinska et al. 2009; Chattopadhyay, Marques et al. 2010). Die Induktion von Zelltod ist physiologisch wichtig zur Erhaltung der Gewebshomöostase, jedoch weisen Tumorzellen oft eine Resistenz gegenüber diesem Regulationsmechanismus auf. Apoptose kann über bestimmte Todesrezeptoren, wie beispielsweise Fas (CD95), oder intrinsisch über das Mitochondrium unter Beteiligung von Proteinen der Bcl-2 Familie ausgelöst werden. RIG-I-Liganden sind in der Lage effizient mitochondriale Apoptose in Melanomzellen auszulösen (Poeck, Besch et al. 2008). Dabei zeigte sich die RIG-I vermittelte Apoptose vor allem in Tumorzellen, wohingegen nicht-maligne Zellen durch das antiapoptotische Protein Bcl-x<sub>L</sub> geschützt waren (Besch, Poeck et al. 2009). **Abbildung 3** zeigt die verschiedenen Effekte einer RIG-I-Aktivierung durch den synthetischen Liganden 5'ppp-siRNA.



**Abbildung 3: Antivirale Immunantwort nach RIG-I-Aktivierung durch 5' ppp-RNA**

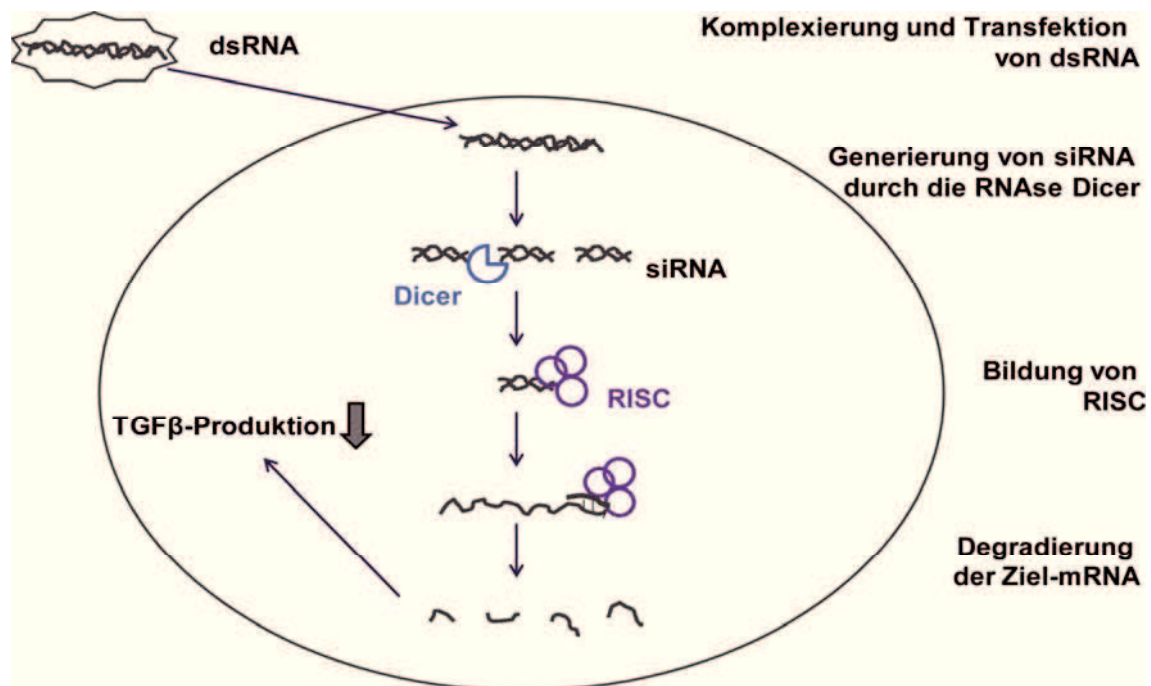
Die zytosolische Helikase RIG-I erkennt 5' ppp-RNA und aktiviert über den mitochondrialen Adapter IPS-1 die Transkriptionsfaktoren IRF-3, IRF-7 und NFκB, welche die Transkription verschiedener in der Immunantwort und Apoptose involvierter Proteine initiieren.

### 1.3.3. Bifunktionelle 5' ppp-siRNA gegen TGFβ<sub>1</sub>

In einem vorausgegangenen Projekt konnten wir die Wirksamkeit einer Immuntherapie des Pankreaskarzinoms mit 5'-modifizierter Triphosphat-siRNA gegen das murine TGFβ<sub>1</sub> im orthotopen Panc02-Pankreaskarzinom-Mausmodell zeigen (Ellermeier, Wei et al. 2013). Dabei vereinte ppp-TGFβ eine funktionelle Genexpressionshemmung des immunsuppressiven Zytokins TGFβ<sub>1</sub> mit einer gleichzeitigen RIG-I-vermittelten Immunaktivierung in einem Molekül.

Das Prinzip der RNA-Interferenz spielt physiologisch eine wichtige Rolle in der Genregulation normaler Zellen. Mittels kleiner regulatorischer RNA (ca. 20-30 Nukleotide) kann die spezifische Genexpression auf interne und externe Stimuli an die jeweilige Stoffwechselsituation angepasst werden (Jinek and Doudna 2009). Für das so genannte *gene silencing* macht man sich dieses Prinzip der RNA-Interferenz zu Nutze. Dabei wird eine doppelsträngige RNA (dsRNA) durch Komplexbildung mit einem Transfektionsagens membrangängig gemacht, um diese in die Zelle einzuschleusen. Im Zytosol wird aus dieser dsRNA mit Hilfe der Endonuklease *Dicer* eine sog. *small*

*interfering* RNA (siRNA) generiert (Bernstein, Caudy et al. 2001). Die siRNA bindet daraufhin an Proteine der *argonaute* Familie und bildet so den Kern des *RNA-induced silencing complex* (RISC) (Hutvagner and Simard 2008). Mit Hilfe der spezifischen Sequenz der siRNA bindet RISC an die korrespondierende *messenger* RNA (mRNA) im Zytosol und führt dadurch zu deren Degradierung und Unterdrückung der Translation. Somit kann die Produktion des Zielproteins, im vorliegenden Projekt die von TGF $\beta_1$ , hochspezifisch verhindert werden (**Abbildung 4**).



**Abbildung 4: Prinzip der RNA-Interferenz**

Nach Komplexierung mit kationischen Lipiden erfolgt die Transfektion der RNA in die Tumorzelle. Dort wird durch die RNase Dicer siRNA generiert. Diese bindet an RISC und führt zur Degradierung der Ziel-mRNA (in unserem Falle TGF $\beta_1$ ) und somit zu einer verminderten Produktion des Zielproteins.

Der *gene silencing* Effekt von TGF $\beta_1$  ließ sich sowohl *in vitro* als auch *in vivo* in deutlich verminderten TGF $\beta_1$ -Spiegeln in Mäusen mit Pankreaskarzinomen nachweisen (Ellermeier, Wei et al. 2013). Die murine Pankreaskarzinomlinie Panc02 zeigte nach Transfektion mit ppp-TGF $\beta$  eine Hochregulation von MHC-I und sezernierte IFN $\beta$ , IL-6 und CXCL10 als Zeichen einer RIG-I-Aktivierung durch die ppp-siRNA. Darüber hinaus zeigte sich eine effektive Apoptoseinduktion. Die Gabe von ppp-TGF $\beta$  *in vivo* resultierte in einer schnellen und starken Immunaktivierung und wirkte sich positiv auf das Überleben von Mäusen mit orthotopen Pankreaskarzinomen aus.

#### 1.3.4. Einfluss von Chemotherapeutika auf Immunzellen

Neben der direkten Zytotoxizität auf Tumorzellen und der nichtselektiven Zytotoxizität auf andere sich schnell teilende Zellpopulationen üben Chemotherapeutika auch diverse Effekte auf das Immunsystem aus. Obwohl den meisten Zytostatika eine immunsuppressive Wirkung zugeschrieben wird, gibt es auch Erkenntnisse, dass sie eine entscheidende Rolle in der antitumoralen Immunantwort spielen (Menard, Martin et al. 2008). So tragen gewisse Zytostatika beispielsweise zur Eliminierung immunsuppressiver Zellpopulationen, wie regulatorischer T-Zellen und myeloider Suppressorzellen, bei (Zitvogel, Apetoh et al. 2008). Zudem wurde beschrieben, dass Zytostatika einen sogenannten immunogenen Zelltod auslösen können, der zu einer adaptiven Immunantwort mit CTL-vermittelter Tumorkontrolle führt (Green, Ferguson et al. 2009).

Im Folgenden werden kurz die bekannten immunologischen Eigenschaften der in der Therapie des Pankreaskarzinoms etablierten Zytostatika Gemcitabin, Oxaliplatin und 5-FU beschrieben. Gemcitabin erhöht *in vitro* die Sensitivität von Tumorzellen gegenüber CTL-vermittelter Zytotoxizität (Dauer, Herten et al. 2005). Durch Gemcitabin induzierter Zelltod *in vivo* verbessert die Antigenpräsentation von Tumorantigenen durch DC (Nowak, Robinson et al. 2003). Zudem konnten synergistische Effekte von Gemcitabin mit einer auf CD40-Ligand bzw. DC basierenden Immuntherapie in Kolonkarzinom- und Pankreaskarzinommodellen nachgewiesen werden (Nowak, Robinson et al. 2003; Bauer, Bauernfeind et al. 2007). Ein weiterer immunmodulatorischer Effekt von Gemcitabin und 5-FU ist die Eliminierung myeloider Suppressorzellen (Suzuki, Kapoor et al. 2005; Vincent, Mignot et al. 2010). 5-FU induziert in Tumorzellen die Expression von *heat shock* Proteinen, was die Antigenpräsentation durch DC fördert (Galetto, Buttiglieri et al. 2003). Eine Hochregulation von CD95 erhöht die Sensitivität von Kolonkarzinomzellen gegenüber CTL-vermitteltem Zelltod. Auch verbessert 5-FU die Effektivität von DC- bzw. Peptid-basierter Tumorstoffen (Tanaka, Yamaguchi et al. 2002; Correale, Del Vecchio et al. 2005). Oxaliplatin verbessert die Kreuzpräsentation von Tumorantigenen auf DC durch Aktivierung von TLR4 (Apetoh, Ghiringhelli et al. 2007). Des Weiteren induziert Oxaliplatin die Translokation von Calreticulin auf die Tumorzelloberfläche, was die Antigenpräsentation durch DC fördert und zu einer CTL-Antwort führt (Tesniere, Schlemmer et al. 2010).

### 1.3.5. Chemoimmuntherapie

Auf Grund ihrer Toxizität auf sich schnell teilende Zellen des Immunsystems wurde den Chemotherapeutika lange eine immunsuppressive Wirkung zugeschrieben und deshalb eine Kombination mit Immuntherapien als nicht sinnvoll erachtet. Wie oben beschrieben wirken Chemotherapeutika jedoch nicht ausschließlich über ihre Zytotoxizität, sondern können vielmehr auch zu einer aktiven antitumoralen Immunantwort beitragen (siehe 1.3.4.). Somit ergibt sich die Möglichkeit eine etablierte Chemotherapie mit neuen Ansätzen der Immuntherapie zur sogenannten Chemoimmuntherapie zu kombinieren um additive oder synergistische Effekte in der Tumorthherapie zu erzielen (Koido, Homma et al. 2011). Eine kombinierte Therapie aus VEGFR-Vakzin und Gemcitabin sowie eine Chemoimmuntherapie aus Vakzinierung mit Tumorantigen-beladenen DC und gleichzeitiger Gabe von Gemcitabin wurden beispielsweise bereits in ersten klinischen Studien getestet (Miyazawa, Ohsawa et al. 2010; Bauer, Dauer et al. 2011).

### 1.4. Zielsetzung dieser Arbeit

In vorausgegangenen Studien konnte unsere Arbeitsgruppe die zytosolische Helikase RIG-I als Zielstruktur für eine Immuntherapie des Pankreaskarzinoms identifizieren und in einem präklinischen Tumormodell mit einer bifunktionellen siRNA, die RIG-I Aktivierung mit TGF $\beta$  *gene silencing* kombiniert, effektive antitumorale Immunantworten induzieren (Ellermeier, Wei et al. 2013). In der hier vorliegenden Arbeit soll untersucht werden, wie sich eine kombinatorische Gabe von ppp-TGF $\beta$  mit klinisch angewandten Chemotherapeutika, die in der Therapie des Pankreaskarzinoms etabliert sind, als kombinierte Chemoimmuntherapie auf die Induktion von Apoptose von Pankreaskarzinomzellen auswirkt. Dies soll modellhaft an der murinen Zelllinie Panc02 *in vitro* und *in vivo* untersucht werden. Zudem sollen auch Untersuchungen mit humanen Pankreaskarzinomzelllinien durchgeführt werden. Dabei liegt der Fokus auf folgenden Aspekten:

- Chemosensitivität von murinen und humanen Pankreaskarzinomzellen gegenüber Gemcitabin, 5-FU und Oxaliplatin
- Sensitivität von murinen und humanen Pankreaskarzinomzellen gegenüber einer kombinierten Chemoimmuntherapie aus bifunktioneller 5'ppp-modifizierter siRNA gegen TGF $\beta_1$  und den oben genannten Chemotherapeutika
- *In vivo* Evaluation der Chemoimmuntherapie im Panc02-Maustumormodell

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Zellbiologische Methoden

#### 2.1.1. Zellkultur

Alle Arbeiten mit Zelllinien wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt (Sicherheitswerkbank von Thermo Scientific, Deutschland). Die Zelllinien wurden in einem Zellkulturschrank (Heraeus Holding GmbH, Deutschland) bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95%, einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 10% und einer Temperatur von 37°C kultiviert und sämtliche Inkubationsschritte unter diesen Bedingungen durchgeführt. In 75 bis 175 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen (Greiner Bio-One GmbH, Deutschland) wurden die Zellen in DMEM *High Glucose* (4,5 g/l) Medium (PAA Laboratories GmbH, Österreich) mit 10% hitzeinaktiviertem FBS (Gibco, Life Technologies, Deutschland), 2 mM L-Glutamine, 100 U/l Penicillin und 0,1 mg/ml Streptomycin (alle PAA Laboratories) passagiert. Für die *in vitro*-Transfektion wurde Medium je ohne Zusatz von Antibiotika verwendet.

Je nach Bedarf wurden die Zelllinien zwei bis dreimal pro Woche im Verhältnis 1:5 bis 1:10 geteilt. Dazu wurden die adhärenenten Zellen mit Hilfe von 1x Trypsin + EDTA (PAA Laboratories) geerntet, in Medium aufgenommen, zentrifugiert und in frischem Medium in neuen Zellkulturflaschen weiterkultiviert. Die Zentrifugation der Zellen erfolgte bei 4°C für 5 bis 7 min bei 400x g (Heraeus Multifuge 3L-R, Thermo Fisher Scientific).

In regelmäßigen Abständen wurden die Zellkulturen auf Infektion mit Mycoplasmen getestet (MycoAlert, *Mycoplasma Detection Kit*, Lonza, USA). Nur mycoplasmenfreie Zelllinien wurden für die Experimente verwendet.

Zur Ermittlung der Zellzahl wurde ein Zellaliquot in einer 0,4%igen Trypanblau-Lösung verdünnt und in einer Neubauer-Zählkammer mit Hilfe eines Mikroskops (Axiovert 25, Zeiss) ausgezählt. Durch das Anfärben mit Trypanblau auf Grund mangelnder Membranintegrität kann man dabei die toten von den vitalen Zellen abgrenzen. Die im Folgenden angegebenen Zellzahlen beziehen sich nur auf die Menge vitaler Zellen. Die Zellzahl pro ml lässt sich aus folgender Formel berechnen:

$$\frac{\text{Anzahl der vitalen Zellen}}{\text{Anzahl der ausgezählten Großquadrate}} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10.000$$

## 2.1.2. Zelllinien

### 2.1.2.1. Murine Zelllinien

Die murine Zelllinie Panc02 stammt von einem chemisch induzierten duktalem Adenokarzinom des Pankreas aus C57BL/6 Mäusen und wurde uns freundlicherweise von Dr. C. Bruns (LMU München) zur Verfügung gestellt. Des Weiteren wurden Zelllinien aus genetisch veränderten Mausstämmen mit spontanen Pankreaskarzinomen verwendet, die von PD Dr. J. Siveke zur Verfügung gestellt wurden (II. Medizinische Klinik und Poliklinik, TU München). Dabei handelt es sich um Mäuse mit Mutation im Kras-Gen ( $Kras^{G12D}$ ), wobei die Expression des Transgens pankreasspezifisch über p48-Cre reguliert wird. Ein Tierstamm hat zusätzlich eine transgene Überexpression von TGF $\alpha$  unter Kontrolle des Elastase-Promotors. Diese Mäuse entwickeln spontan invasive duktales Pankreaskarzinome. Zudem stammte eine Zelllinie aus Tieren mit Kras- und p53<sup>R127H</sup>-Mutation. (Hingorani, Petricoin et al. 2003; Hingorani, Wang et al. 2005; Siveke, Einwachter et al. 2007). Einen Überblick über die murinen Zelllinien gibt **Tabelle 1**.

Murine Zelllinien	Pathogenese
Panc02	Chemisch-induziert
9801 510 479	p48-Cre; $Kras^{G12D}$
640008 210 159 510 481	p48-Cre; $Kras^{G12D}$ ; Ela-Tgfa
110 299	p48-Cre; $Kras^{G12D}$ ; p53 <sup>R127H</sup>

**Tabelle 1: Murine Pankreaskarzinomzelllinien**

### 2.1.2.2. Humane Zelllinien

Die in dieser Arbeit verwendeten humanen Pankreaskarzinomzelllinien erhielten wir freundlicherweise von Prof. P. Michel (Klinik für Gastroenterologie, Philipps-Universität Marburg). Die gut charakterisierten Zelllinien besaßen zum Teil ein mutiertes p53 (PANC1, MIA Paca-2, BxPc-3) und andererseits den p53 Wildtyp (IMIM-PC1, PaTu 8988t, SUIT 007).

### 2.1.3. Stimulation mit Interferon- $\alpha$

Die Expression von RIG-I (und MDA-5) unterliegt einem durch Typ I-Interferone induzierbaren, positiven Feedbackmechanismus (Yoneyama, Kikuchi et al. 2005). Um die Induktion von RIG-I (und MDA-5) zu untersuchen, stimulierten wir sowohl murine als auch humane Pankreaskarzinomlinien mit Interferon alpha (IFN $\alpha$ ). Dazu wurden in 6-Well-Platten jeweils  $10^6$  Zellen ausgesät und über Nacht kultiviert, um eine vollständige Adhärenz zu erreichen. Rekombinantes speziesspezifisches IFN $\alpha$  (Miltenyi Biotec GmbH, Deutschland) wurde in einer Konzentration von 100 U/ml zu den murinen Zelllinien und 1000 U/ml zu den humanen Zelllinien hinzugefügt und nach 18 h Inkubationszeit die RNA der Zellen isoliert.

### 2.1.4. Small interfering RNA

Die siRNA gegen humanes und murines TGF $\beta_1$  (desweiteren bezeichnet als OH-hTGF $\beta$  bzw. OH-mTGF $\beta$ ) wurden nach publizierten Vorlagen von Metabion (Martinsried, Deutschland) hergestellt (Reynolds, Leake et al. 2004). Der erfolgreiche Knockdown von TGF $\beta_1$ -mRNA wurde mittels quantitativer *RealTime*-PCR überprüft (s. 2.2.4.). Als Negativkontrolle diente dabei eine unspezifische siRNA (OHc bzw. OH-GFP). Beide Sequenzen binden weder an einer murinen noch einer humanen mRNA (Besch, Poeck et al. 2009). **Tabelle 2** gibt einen Überblick über sämtliche in dieser Arbeit verwendete siRNA-Sequenzen.

Zielgen	siRNA (Sequenz 5' $\rightarrow$ 3')
Kontrolle (OHc)	GCGCUAUCCAGCUUACGUA
Kontrolle (OH-GFP)	GAUGAACUUCAGGGUCAGC
TGF $\beta_1$ murin 1372	GAACUCUACCAGAAAUUAU
TGF $\beta_1$ human 1247	GUACACACAGCAUAUAUAU
TGF $\beta_1$ human 1380	CCAGAAAUACAGCAACAAU

**Tabelle 2: siRNA-Sequenzen**

### 2.1.5. In Vitro- Transfektion

Für die Transfektion mit siRNA wurden je nach Versuchsaufbau  $10^4$  bis  $10^6$  Tumorzellen in 6-, 12- oder 24-Well-Platten ausgesät und über Nacht bei 37°C inkubiert bis sie vollständig adhäriert waren. Die Transfektion erfolgte in Kulturmedium



ohne den Zusatz von Antibiotika. Die gewünschte Menge RNA wurde in Opti-MEM® (Gibco, Invitrogen) suspendiert, ebenso wie eine adäquate Menge Transfektionsreagenz Lipofectamin 2000 oder Lipofectamin RNAiMax (beide von Invitrogen). So wurde beispielsweise für 2 µg/ml siRNA 1,5 µl Lipofectamin verwendet und alle weiteren Konzentrationen diesem Verhältnis angepasst. Nach 5 min wurde das Lipofectamin gemäß den Herstellerangaben zur RNA gegeben, das Gemisch kurz gevortext und weitere 20 min stehen gelassen, so dass sich die RNA mit dem Transfektionsreagenz zu Komplexen zusammenlagern konnte. Die lipophilen Komplexe haben die Eigenschaft die Zellmembran zu durchdringen und so die RNA in das Zytoplasma zu schleusen. Nach der Transfektion wurden die Zellen je nach Fragestellung 12 bis 72 h inkubiert.

### 2.1.6. Behandlung mit Zytostatika

Die Chemotherapeutika Gemcitabin, 5-Fluoruracil und Oxaliplatin wurden von der Zytostatikazubereitung des Klinikums Großhadern (LMU München) in den folgenden Konzentrationen bezogen (siehe **Tabelle 3**), mit Komplettmedium auf die gewünschten Konzentrationen verdünnt und *in vitro* direkt in das Kulturmedium gegeben.

Chemotherapeutikum	Ausgangskonzentration	Molare Masse
Gemcitabin	38 mg/ml	263 mM
5-Fluoruracil	50 mg/ml	130 mM
Oxaliplatin	5 mg/ml	397 mM

**Tabelle 3: Übersicht über die verwendeten Zytostatika**

In den *in vitro* Experimenten wurden Konzentrationen zwischen 1 nM und 100 µM verwendet. Der suboptimale Wirkungsbereich eines Chemotherapeutikums wurde als logEC75 festgelegt, das heißt die Konzentration, bei der noch 75 % der behandelten Zellen vital erscheinen.

### **2.1.7. Funktionelle Analysen**

#### **2.1.7.1. ELISA zum Nachweis von CXCL10 (IP-10)**

Zum Nachweis des sezernierten Chemokins CXCL10 als Zeichen einer Immunaktivierung wurde *in vitro* Zellkulturüberstand 24 h nach Transfektion entnommen und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Die Quantifizierung von murinem und humanen CXCL10 erfolgte mittels ELISA-Kit (R&D Systems, Deutschland) und wurde nach Protokoll des Herstellers durchgeführt. Letztlich wurde die Absorption bei 450 nm colorimetrisch bestimmt (Mithras LB 940, Berthold Technologies). Mit Hilfe der Standardkurve wurde die Proteinkonzentration aus der optischen Dichte berechnet. Die untere Nachweisgrenze lag laut Herstellerangaben bei 1,67 bzw. 2,2 pg/ml für humanes bzw. murines CXCL10.

#### **2.1.7.2. Durchflusszytometrische Analyse zum Nachweis von MHC-I**

Als Zeichen einer Immunaktivierung wurde die Hochregulation von MHC-I-Molekülen auf der Zelloberfläche mittels Durchflusszytometrie gemessen. Dazu wurden die Tumorzellen 24 h nach Transfektion mit Trypsin geerntet, abzentrifugiert und einmal mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit einem monoklonalen Antikörper gegen MHC-I für 20 min auf Eis unter Lichtausschluss (murin: H-2D<sup>b</sup>, Klon KH95, human: HLA-A,B,C, Klon G46-2.6, beide FITC-konjugiert, BD Pharmingen, Deutschland). Nach einem weiteren Waschschrift wurden die Zellen durchflusszytometrisch (FACS Calibur, BD, Deutschland) analysiert. Die Rohdaten wurden mit der Software FlowJo Version 7.5 ausgewertet.

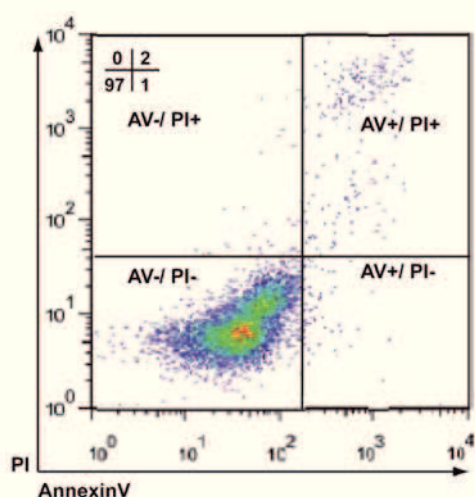
#### **2.1.7.3. Bestimmung der Zellviabilität**

Die Viabilität der Zellen wurde mittels dem Vitalitätstest *Cell Titer Blue* (Promega, USA) bestimmt. Dieser Assay misst die reduktive Umsetzung von Resazurin in fluoreszierendes Resorufin durch verschiedene, zelleigene Redoxenzyme. Je höher der Anteil vitaler, stoffwechselaktiver Zellen, desto höher der Umsatz in Resorufin. Dazu wurden die Zellen in 12- oder 24-Well-Platten 24 bis 72 h nach Gabe der Chemoimmuntherapie kultiviert. Zur Messung wurde das Medium entfernt und durch Kulturmedium ohne Phenolrot (PAA, Österreich) ersetzt. Im Verhältnis 1 zu 10 zum Mediumvolumen wurde das *Cell Titer Blue* Reagenz dazugegeben und je nach Zelllinie nach einer Stunde Inkubation bei 37°C die Fluoreszenz bei 530 nm gemessen (Mithras

LB 940, Berthold Technologies). Für die Auswertung wurde stets der gemessene Wert der unbehandelten Kontrolle als 100 % vital gesetzt und alle weiteren Werte prozentual darauf bezogen.

#### 2.1.7.5. Apoptosebestimmung mittels Annexin V und Propidiumjodid

Zur Quantifizierung von apoptotischen Zellen nach verschiedenen Behandlungen mittels Durchflusszytometrie wurde die Färbemethode mit Annexin V und Propidiumjodid (PI) verwendet. Dazu wurden die Zellen zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet, zweimal mit PBS gewaschen und anschließend in 150  $\mu$ l kalziumhaltigem Puffer mit 1  $\mu$ l Annexin V (entweder APC oder FITC konjugiert, Invitrogen, Deutschland) und 0,5  $\mu$ l PI (50  $\mu$ g/ml Stocklösung, Sigma) auf Eis gefärbt. Annexin V bindet an Phosphatidylserin, welches im Rahmen frühapoptotischer Prozesse an die Außenseite der Zellmembran transloziert. PI dagegen interkaliert erst nach Zerstörung der Zellmembran durch nekrotische Prozesse in die Basenpaare der DNA. Somit ist mittels durchflusszytometrischer Analyse eine Unterscheidung in lebende Zellen (Annexin V-/ PI-), früh apoptotische Zellen (Annexin V+/ PI-), sekundär apoptotische Zellen (Annexin V+/ PI+) und nekrotische Zellen (Annexin V-/ PI+) möglich (**Abbildung 5**). Bei der Auswertung wurde die Vitalität der behandelten Gruppen jeweils in Relation zu den lebenden Zellen der unbehandelten Kontrolle (Annexin V-/PI-) angegeben. Die spontane Apoptoserate in den unbehandelten Kontrollen betrug weniger als 5%.



**Abbildung 5: Repräsentative Dotplot Analyse der Annexin V/ PI-Färbung.**

Die Abbildung zeigt eine vitale, unbehandelte Population der Zelllinie Suit007. 97 % der Zellen sind Annexin V/ PI negativ (linker unterer Quadrant).

## 2.2. Molekularbiologische Methoden

### 2.2.1. *In vitro*-Transkription

Die ppp-siRNA wurde nach dem von Besch et al. (Besch, Poeck et al. 2009) publizierten Verfahren durch *in vitro*-Transkription mittels T7-Polymerase hergestellt. Die dazu notwendigen DNA-Templates (Metabion, Deutschland) für die Herstellung der korrelierenden 5'-ppp-modifizierten siRNA enthalten eine zusätzliche Promotorsequenz für die T7 RNA-Polymerase, welche die Triphosphatgruppe am 5'-Ende synthetisiert. Die in **Tabelle 4** angegebenen Sequenzen wurden in der hier vorliegenden Arbeit zur Transkription verwendet.

Zielgen	DNA-Template (Sequenz 5' → 3')
Murines TGFβ1 1372 <i>sense</i>	TATATTTCTGGTAGAGTTC <b>CTATAGTGAGTCG</b>
Murines TGFβ1 1372 <i>antisense</i>	GAACCTCTACCAGAAATATA <b>CTATAGTGAGTCG</b>
Humanes TGFβ1 1380 <i>sense</i>	ATTGTTGCTGTATTTCTGG <b>CTATAGTGAGTCG</b>
Humanes TGFβ1 1380 <i>antisense</i>	CCAGAAATACAGCAACAAT <b>CTATAGTGAGTCG</b>
Humanes TGFβ1 1247 <i>sense</i>	ATATATATGCTGTGTGTAC <b>CTATAGTGAGTCG</b>
Humanes TGFβ1 1247 <i>antisense</i>	GTACACACAGCATATATAT <b>CTATAGTGAGTCG</b>
Kontrolle (GFP) <i>sense</i>	GCTGACCCTGAAGTTCATC <b>CTATAGTGAGTCG</b>
Kontrolle (GFP) <i>antisense</i>	GATGAACTTCAGGGTCAGC <b>CTATAGTGAGTCG</b>

**Tabelle 4: Sequenzen der DNA-Templates.** Die Promotorsequenz ist jeweils hervorgehoben.

Im ersten Schritt wird ein doppelsträngiges DNA-Template hergestellt. Dafür wird zunächst der T7 Promotor Primer (Sequenz 5'>3'TAATACGACTCACTATA, Metabion) an die einzelsträngigen DNA-Templates bei 70°C (5 min im Thermocycler, Biometra GmbH, Deutschland) angelagert. Dieser Schritt erfolgt im Hybridisierungspuffer (TE-Puffer: 10 mM TRIS, 1 mM EDTA, pH 7,4). Nach Abkühlen auf Raumtemperatur gibt man im nächsten Schritt jeweils die Exo-Minus Klenow DNA-Polymerase (20 Units/μl) und den dazugehörigen Klenow *Fill-In* Puffer (Epicentre Biotechnologies, USA), sowie einen 2,5 mM Mix aus dNTPs dazu, um das doppelsträngige Template zu erhalten. Nach weiteren 5 min bei 70°C und langsamen Abkühlen auf Raumtemperatur sind die Templates fertig zum weiteren Gebrauch oder können bei -20°C aufbewahrt werden.

Zur Herstellung der 5'-ppp-modifizierten siRNAs (des Weiteren bezeichnet als ppp-siRNA) wurde das MegashortSkript™ T7 Kit (Ambion, Texas) verwendet.

Der Anteil der benötigten Nukleotide wurde aus der Sequenz der zu synthetisierenden RNA berechnet. Das jeweilige DNA-Template wurde zusammen mit den

entsprechenden Anteilen ATP, GTP, UTP und CTP sowie RNase-freiem Wasser, 10x T7 Rxn Puffer und der T7 RNA-Polymerase jeweils getrennt für den *sense*- bzw. *antisense*- Strang über mehrere Stunden bei 37°C inkubiert, dann zusammen pipettiert und über Nacht wiederum bei 37° inkubiert.

Am nächsten Tag wurde das DNA-Template für 30 min bei 37°C mittels Turbo-DNAse verdaut, welche daran anschließend mit Hilfe von Ammonium-Acetat wieder inaktiviert wurde. Zur Aufreinigung der neu synthetisierten RNA wurde diese mit Phenol-Chloroform-Amylalkohol durchmischt. Nach 5 min Zentrifugation bei 12.000 g bilden sich zwei Phasen aus. Die untere besteht aus Chloroform, die obere aus Phenol und enthält die RNA. Die obere Phase wurde abpipettiert, erneut mit Chloroform gemischt und ebenso zentrifugiert. Zur Ausfällung der RNA wurde wiederum die obere Phase abgenommen, diese mit 100% Ethanol durchmischt und bei -20°C mindestens zwei Stunden gelagert. Bei dieser Temperatur fällt die RNA aus und wurde anschließend in einer Kühlzentrifuge (Eppendorf 5415R) bei 4°C und 14.000 g innerhalb von 30 min abzentrifugiert. Das so erhaltene RNA-Pellet wurde in RNase freiem Wasser gelöst und mit Hilfe der *Mini Quick Spin RNA Columns* (Roche) aufgereinigt. Die Konzentration der ppp-siRNA wurde photometrisch bestimmt (NanoPhotometer, Implen, Deutschland).

Die Funktion aller so generierten ppp-siRNA wurde vor Verwendung *in vitro* validiert. Zur Kontrolle wurde die murine Pankreaszelllinie Panc02 mit 1 mg/ml ppp-siRNA transfiziert und nach 24 h die Expression von MHC-I durchflusszytometrisch bestimmt. Nur ppp-siRNA, die eine deutliche Hochregulation von MHC-I induzieren konnte, wurde für die weiteren Versuche verwendet. Des Weiteren wurde die Genexpression-hemmende Wirkung mittels *RealTime*-PCR getestet (s. **2.2.4.**).

### **2.2.2. Isolierung und Quantifizierung von Zellkultur-RNA**

Zur Gewinnung von RNA wurden je Probe 10<sup>6</sup> Tumorzellen in 6-Well-Platten ausgesät und nach Adhärenz je nach Versuchsaufbau behandelt. Die Lyse der Zellen erfolgte jeweils 18 h nach Behandlung. Zur Isolierung der gesamten RNA wurde das *RNeasy Mini Kit* (Quiagen, Deutschland) verwendet. Nach Herstellerprotokoll wurden die Zellen lysiert, homogenisiert und in mehreren Waschschritten die RNA in Wasser herausgelöst. Die so aufgereinigte RNA wurde photometrisch quantifiziert und bei -20°C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

### 2.2.3. Reverse Transkription

Mit Hilfe des *ProtoScript M-MuLV First Strand cDNA Synthesis Kit* (New England BioLabs, Deutschland) wurde die aus Tumorzellen isolierte RNA in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Verwendet wurde dazu eine Ausgangsmenge von 1 µg RNA pro Probe. Nach Protokoll des Herstellers wurde die RNA 5 min bei 70°C im Thermocycler (Biometra GmbH) denaturiert und nach Zufügen der Reversen Transkriptase und den nötigen Reagenzien in einer einstündigen Reaktion bei 42°C in cDNA umgeschrieben. Nach weiteren 10 min bei 80°C zur Inaktivierung der Transkriptase wurde die cDNA mit nukleasefreiem Wasser auf 50 µl verdünnt und bei -20°C aufbewahrt.

### 2.2.4. Quantitative *RealTime*-PCR

Für die quantitative *RealTime*-PCR (qRT-PCR) wurde der Light Cycler 480 II von Roche und das dazu gehörige *Light Cycler 480 Probes Master Kit* verwendet. Die Primer wurden mittels des *Universal Probe Library Assay Design Centers* (Roche) ermittelt und von Metabion oder MWG Biotech bezogen. Die entsprechenden Sonden wurden dem Universal Probe Library Set (ebenfalls Roche) entnommen. Je Probe wurde ein zweifacher Ansatz aus folgenden Komponenten angesetzt:

Reagenz	Menge
H <sub>2</sub> O (PCR-grade)	1,5 µl
<i>Primer forward</i>	0,2 µl
<i>Primer reverse</i>	0,2 µl
<i>Light Cycler 480 Probes Master</i>	5 µl
Sonde	0,1 µl
cDNA	3 µl
<b>gesamt</b>	<b>10 µl</b>

**Tabelle 5: Pipettieransatz für die qRT-PCR**

Im LightCycler erfolgte die Inkubation bei 95°C, die Amplifikation bei 60°C und das Herunterkühlen auf 40°C. Insgesamt wurden 45 Zyklen gefahren. Alle in dieser Arbeit verwendeten Primersequenzen (jeweils von 5' nach 3'), sowie die dazugehörigen Sondennummern finden sich in **Tabelle 6**.

<b>Zielgene murin</b>	<b>Sequenz forward</b>	<b>Sequenz reverse</b>	<b>Sonde</b>
HPRT	GGAGCGGTAGCACCTCCT	CTGGTTCATCATCGCTAATCAC	69
RIG-I	GACCCACCTACATCCTCAG	GGCCCTTGTTGTTCTTCTCA	72
MDA5	CACCTGCAATTCCAAAATCTTA	CTATTAACCGTGTTCAAACATGAA	82
IFN $\beta$	CCCAGTGCTGGAGAAATTGT	ACTGCCTTTGCCATCCAA	50
TGF $\beta$ 1	AACTAAGGCTCGCCAGTC	TCAGCTGCACTTGCAGGA	72
Noxa	CAGATGCCTGGGAAGTCG	TGAGCACACTCGTCCTTCAA	15
Puma	TTCTCCGGAGTGTTTCATGC	TACAGCGGAGGGCATCAG	79
Bim	GGAGACGAGTTCAACGAACTT	AACAGTTGTAAGATAACCATTGAGG	41
Casp. 9	TCGCAGAAACAGCATTGG	GTACATCGAGACCTTGGATGG	50
Bcl-2	GTACCTGAACCGGCATCTG	GGGGCCATATAGTTCCACAA	69
Mcl-1	CGTGTTATGCTCCAGTTCC	AAAATGGCCAGTGAAGAGCA	69
<b>Zielgene human</b>			
HPRT	TGACCTTGATTTATTTTGCATACC	CGAGCAAGACGTTTCAGTCCT	73
RIG-I	TGGACCCTACCTACATCCTGA	GGCCCTTGTTGTTTTTCTCA	69
MDA-5	AGTTTGGCAGAAGGAAGTGTC	GGAGTTTTCAAGGATTTGAGC	36
IFN $\beta$	CCCAGGAGGTTCTCAACAAT	CTTTGCTATTTTCAGACAAGATTCA	25
TGF $\beta$ 1	GCAGCACGTGGAGCTGTA	CAGCCGTTGCTGAGGTA	72
Puma	GAGATTGTACAGGACCCTCCA	GACCTCAACGCACAGTACGA	68
Noxa	CCTGAGTTGAGTAGCACACTCG	GGAGATGCCTGGGAAGAAG	67
Apaf-1	CCTGTTGTCTCTTCTCCAGTGT	AAAACAACCTGGCCTCTGTGG	39
p53	CTCTCCCCAGCCAAAGAAG	CTCTCGGAACATCTCGAAGC	12
Bim	GGCCCCTACCTCCCTACA	GGGGTTTGTGTTGATTTGTCA	21
Bax	CAAGACCAGGGTGGTTGG	CACTCCCGCCACAAAGAT	55
Bcl-xL	GCTGAGTTACCGGCATCC	CTGAAGGGAGAGAAAGAGATTCA	10
Bcl-2	TACCTGAACCGGCACCTG	GCCGTACAGTTCCACAAAGG	75
Mcl-1	AAGCCAATGGGCAGGTCT	GAAGTCCACAAACCCATCCTT	4

**Tabelle 6: Primersequenzen für die qRT-PCR**

Die Analyse der Daten erfolgte mittels der LightCycler 480 Software, Version 1.5.0.39. Die Quantifizierung der interessierenden cDNA bzw. mRNA erfolgte stets relativ zur konstitutiv exprimierten Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (HPRT). Bei der Auswertung wurde der Mittelwert der HPRT-Messung in der unbehandelten Kontrolle auf 1 gesetzt und jede einzelne Probe darauf bezogen.

### 2.2.5. PCR von humanem RIG-I

Zur Analyse der Expression von humanem RIG-I wurde cDNA aus der Reversen Transkription (s. 2.2.3. und 2.2.4.) in einem Reaktionsansatz von insgesamt 25 µl verwendet (Tabelle 7).

Reagenz	Menge
cDNA	5 µl
<i>Primer forward</i> (10 pmol)	1,5 µl
<i>Primer reverse</i> (10 pmol)	1,5 µl
10x Puffer + Mg	2,5 µl
dNTPs (10mM)	0,5 µl
Taq-Polymerase	0,25 µl
H <sub>2</sub> O	Ad 25 µl

**Tabelle 7: PCR Reaktionsansatz**

Primersequenzen für humanes RIG-I: fw 5'-GCA TAT TGA CTG GAC GTG GCA-3', rev 5'-CAG TCA TGG CTG CAG TTC TGT C-3' (Cui, Imaizumi et al. 2004), (Primer von MWG, alle übrigen Reagenzien von Fermentas).

Die Amplifizierung des Zielgens erfolgte nach folgendem Programm in einem Thermocycler:

1x	94°C	5 min	Denaturierung
30x	94°C	30 sec	Denaturierung
	55°C	30 sec	Primerbindung
	72°C	30 sec	Elongation
1x	72°C	5 min	Elongation

**Tabelle 8: PCR-Zyklen**

Für die Gelelektrophorese wurde ein 1,5% Agarosegel gegossen und mit Ethidiumbromid zur Visualisierung der Proben versetzt. Als Größenmarker wurde die *GeneRuler*™ 100bp *Plus DNA Ladder* (Thermo Fisher Scientific) verwendet. Die Elektrophoresezeit betrug 30 min bei 100 V.



### 2.2.6. Immunfluoreszenz

Für die immunhistochemische Färbung der beiden proapoptotischen Proteine Puma und Noxa wurden als erstes *chamber slides* (Nunc, Rochester, NY, USA) mit Rattenschwanzkollagen (Roche) eine Stunde bei 37°C beschichtet. Anschließend wurden  $3 \times 10^4$  murine bzw. humane Pankreaskarzinomzellen nach CFSE-Färbung (2,5 µM, Sigma) in 250 µl Medium pro Well ausgesät. Im Zuge des Mediumwechsels am nächsten Tag wurden 12,5 nM, 25 nM bzw. 50 nM Gemcitabin auf die Zellen gegeben, um den Einfluss der Chemotherapie auf die Expression der proapoptotischen Proteine nachweisen zu können. Nach 24 h bzw. 48 h Inkubation erfolgte die immunhistochemische Färbung in mehreren Schritten, zwischen denen jeweils gründlich mit PBS gewaschen wurde. Im ersten Schritt wurden die Zellen mit Paraformaldehyd fixiert und anschließend mittels Triton-X 0,2% in PBS permeabilisiert. Unspezifische Bindungen wurden mit 2% BSA geblockt. Daraufhin erfolgte die Inkubation mit den Primärantikörpern gegen Noxa bzw. Puma (polyklonale Kaninchen-Antikörper Anti-Puma ab9643, Anti-Noxa ab36833, jeweils von Abcam) über 60 min bei Raumtemperatur. Nach Abwaschen folgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper gegen Kaninchen IgG (1:200, Sigma). Ab der daraufhin folgenden Färbung mit Alexa633-Streptavidin wurden die weiteren Schritte unter Lichtausschluss durchgeführt. Es folgte die Färbung der Zellkerne mit dem Hoechst-Farbstoff. Zum Schluss wurde der Deckel der *chamber slides* entfernt und die möglichst trockenen Platten mit den fixierten und gefärbten Zellen mittels *Vectashield® mounting medium* (Burlingame, USA) bedeckt und mit einem Deckglas abgedeckt. Die so gefärbten Zellen wurden bei -20°C im Dunkeln aufbewahrt. Die Auswertung erfolgte fluoreszenzmikroskopisch.

## 2.3. Syngenes Panc02-Tumormodell

### 2.3.1. Versuchstiere und Haltung

Sechs Wochen alte, weibliche Mäuse vom Stamm C57BL/6 wurden über Harlan-Winkelmann (Borchen, Deutschland) bezogen. Maximal sechs bis acht Mäuse wurden artgerecht in einem Käfig gehalten und konnten sich mindestens eine Woche in der Tierhaltung akklimatisieren, bevor sie in einen Versuch aufgenommen wurden. Die Durchführung der Tierversuche wurden von der Regierung von Oberbayern genehmigt und wurde gemäß den Bestimmungen des Tierschutzgesetzes durchgeführt (AZ: 55.2-1-54-2531-143-09).

### 2.3.2. Tumorinduktion

Zur Induktion eines subkutanen Pankreastumors wurden Panc02-Zellen aus den Kulturflaschen abgelöst und zweimal sorgfältig mit PBS gewaschen. Je Maus wurden  $0,5 \times 10^6$  Zellen in 150  $\mu$ l PBS suspendiert und subkutan in die rechte Flanke injiziert. Zuvor wurden die Tiere durch Isopropanol kurz betäubt. Zur Messung der Tumorgröße wurde eine digitale Schiebeleiste verwendet und die Tumorgröße nach folgender Formel bestimmt:

$$\text{Tumurlänge in mm} \times \text{Tumorbreite in mm} = \text{Tumorgröße in mm}^2$$

Die Tumorgröße wurde zweimal pro Woche gemessen. Nach durchschnittlich 10 Tagen und einer mittleren Tumorgröße von 25  $\text{mm}^2$  wurden die Tiere in die verschiedenen Therapiegruppen aufgeteilt, so dass die mittlere Tumorgröße in den Behandlungsgruppen zu Beginn der Therapie übereinstimmte. Der Therapieerfolg wurde anhand des Tumorwachstums bestimmt. Bei einer maximalen Größe von 150  $\text{mm}^2$  wurden die Tiere unter Isopropanolnarkose getötet und gegebenenfalls der Tumor zur weiteren Analyse entfernt.

Zur Induktion eines orthotopen Pankreastumors wurden Panc02-Zellen nach sorgfältigem Waschen mit PBS operativ in das Pankreas implantiert. Je Maus wurden  $0,2 \times 10^6$  Zellen in 50  $\mu$ l PBS suspendiert und bis zur Verwendung auf Eis gelagert. Einen Überblick über die Bestandteile der Narkose für die Operation gibt **Tabelle 9**.

Bestandteile der Narkose	Menge in ml
Midazolam (5 mg)	2x 5
Buprenorphin (0,3 mg)	1x 1
Dormitor (Stechampulle)	1x 2
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>13</b>

**Tabelle 9: Zusammensetzung des Narkotikums**

Eine Maus mit 20 g Körpergewicht erhielt 150  $\mu$ l des Narkoseansatzes intraperitoneal. Zur Induktion des orthotopen Tumors wurde ein kleiner Schnitt unterhalb des linken Rippenbogens gesetzt und stumpf erweitert. Die Milz und das daran hängende Pankreas wurden herausgezogen und die Tumorzellen in den milznahen Teil des Pankreas injiziert. Nach Reposition der Organe wurde der Schnitt vernäht. Die Antagonisierung erfolgte nach der Operation mit 200  $\mu$ l Antidot aus folgendem Ansatz:

Bestandteile der Antagonisierung	Menge in ml
Flumazenil (0,5 mg)	5
Naloxon (1,2 mg)	3
Antisedan (0,5ml)	0,5
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>8,5</b>

**Tabelle 10: Zusammensetzung des Antidots**

Am Tag 7 nach orthotoper Tumorinduktion wurde das Anwachsen des Tumors bei ein bis zwei Mäusen kontrolliert, anschließend konnte mit der Therapie begonnen werden. Die Tiere wurden täglich gesichtet. Endpunkt im orthotopen Modell ist das Überleben der Tiere bis zu max. 100 Tage nach Tumorinokulation. Sowohl im subkutanen als auch im orthotopen Modell gab es stets eine Kontrollgruppe von Tieren, die keinen Tumor induziert bekamen.

### 2.3.3. Tumorthherapie

#### 2.3.3.1. Chemotherapie *in vivo*

Als Zytostatikum in der Chemoimmuntherapie *in vivo* wurde Gemcitabin gelöst in PBS intraperitoneal verabreicht. Eine Kontrollgruppe erhielt lediglich PBS. In Vorversuchen wurden verschiedene Konzentrationen von Gemcitabin ausgetestet, wobei eine einmal wöchentliche Gabe von 25 mg/kg Gemcitabin höheren Dosen (50 mg/kg) oder zweimal wöchentlichen Gaben nicht unterlegen war (s. **Abbildung 23**). Für die Versuche im orthotopen Panc02 Tumormodell in dieser Arbeit wurde das für die Tiere am wenigsten belastende Protokoll mit 25 mg/kg Gemcitabin einmal pro Woche ausgewählt.

#### 2.3.3.2. *In vivo*-Injektion von ppp-siRNA

Die Immuntherapie erfolgte zweimal wöchentlich über drei Wochen mittels intravenöser Gabe von 5'ppp-modifizierter siRNA gegen murines TGF $\beta_1$  (ppp- mTGF $\beta$ ). Pro Maus und Injektion wurde eine absolute Menge von 50  $\mu$ g ppp-mTGF $\beta$  komplexiert mit dem Transfektionsreagenz *in vivo* jetPEI (Peqlab, Deutschland) verabreicht. Die Zusammensetzung der Ansätze zeigt **Tabelle 11**.

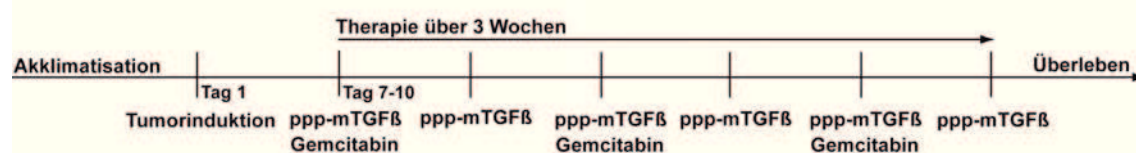
100 µl RNA Ansatz	100 µl jetPEI Ansatz
50 µl Glucose 10%	50 µl Glucose 10%
50 µg ppp-mTGFβ	8 µl jetPEI
Ad 100 µl H <sub>2</sub> O steril	42 µl H <sub>2</sub> O steril

**Tabelle 11: Ansatz für die *in vivo* Injektion**

Beide Ansätze wurden laut Herstellerangaben getrennt gemischt, anschließend das Transfektionsreagenz zur RNA gegeben, sofort intensiv vermischt und für mindestens 15 min komplexiert. Die komplexierte RNA wurde innerhalb von 2 h den Tieren intravenös über die Schwanzvene verabreicht.

### 2.3.3.3. Chemoimmuntherapie *in vivo*

Um das Therapieschema der Chemoimmuntherapie *in vivo* zu veranschaulichen, zeigt folgende Abbildung eine Zeitleiste der *in vivo* Experimente. 7 bis 10 Tage nach Tumorinduktion wurde mit der Chemoimmuntherapie begonnen. Dabei wurde Gemcitabin einmal pro Woche intraperitoneal, sowie ppp-mTGFβ zweimal pro Woche intravenös verabreicht. Die Behandlungsdauer betrug insgesamt drei Wochen.



### 2.3.4. Funktionelle Analysen

#### 2.3.4.1. Zytokinbestimmung aus Serum

Zum Nachweis verschiedener Zytokine im Serum der Versuchstiere wurde je nach Fragestellung 6 h und 30 h nach den therapeutischen Interventionen retroorbital Vollblut entnommen, daraus mittels Zentrifugation Serum gewonnen und bis zur Verwendung bei -20°C aufbewahrt. Als Bezugswert wurde Serum von gesunden Tieren ohne Tumor gewonnen. Zum Nachweis einer Immunaktivierung im Rahmen der Chemoimmuntherapie diente unter anderem die Messung von CXCL10 mittels ELISA (R&D Systems). Das Serum der Tiere wurde im Verhältnis 1:5 verdünnt und der ELISA laut Herstellerangaben durchgeführt. Um das Zielprotein murines TGFβ<sub>1</sub> nach

Chemoimmuntherapie zu quantifizieren wurde das Serum ebenfalls im Verhältnis 1:5 verdünnt und der ELISA (eBiosciences, Deutschland) analog zum Protokoll des Herstellers durchgeführt.

#### 2.3.4.2. Durchflusszytometrie

Zur Untersuchung der mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) wurden wenige Tropfen Vollblut der Tiere in 2,5 ml Puffer aus PBS, 5% FBS und 2,5 mM EDTA aufgenommen. Nach Zentrifugation und zweimaliger Erythrozytenlyse (*BD EryLysis Puffer*) wurden die PBMC in einem Volumen von 40 µl Puffer mit verschiedenen Antikörpern (**Tabelle 12**, alle in einer 1:200 Verdünnung) für 15 min auf Eis inkubiert, gewaschen und anschließend durchflusszytometrisch (FACS Canto II, BD) analysiert. Die Auswertung der Rohdaten erfolgte mittels der FlowJo Software (Version 8.5.3. TriStar).

Antikörper	Konjugat	Klon	Wirt	Isotyp	Marker für
CD3e	APC	145-2C11	Hamster	IgG1	T-Zellen
CD19	PE	1D3	Ratte	IgG2a	B-Zellen
NK1.1	PerCP-Cy5.5	PK136	Maus	IgG2a	NK-Zellen
CD4	PerCP	RM4-5	Ratte	IgG2a	T <sub>H</sub> -Zellen
CD8a	PacificBlue	53-6.7	Ratte	IgG2a	T <sub>K</sub> -Zellen
CD69	FITC	H1.2F3	Hamster	IgG1, λ3	Aktivierung

**Tabelle 12: FACS-Antikörper zur Färbung der PBMC**

#### 2.4. Statistische Analysen

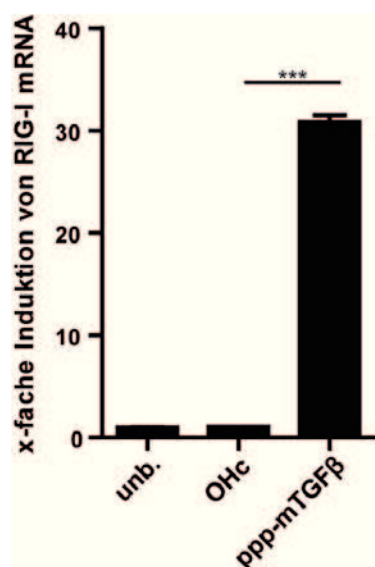
Die angegebenen Daten zeigen Mittelwerte + S.D. (*in vitro* Daten) bzw. S.E.M. (*in vivo* Daten). Signifikante Unterschiede wurden durch zweiseitigen Student-t-Test analysiert, wobei multiple Vergleiche mittels *One-way* ANOVA inklusive Bonferroni Korrektur untersucht wurden. Die statistischen Analysen wurden mittels der Software GraphPad Prism 5 ausgeführt. Ein p-Wert <0,05 wurde als signifikant erachtet.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. *In vitro* Untersuchungen zur Chemoimmuntherapie im murinen Pankreaskarzinommodell

##### 3.1.1. Regulation der RIG-I-Expression

Die Expression der zytosolischen Helikase RIG-I bzw. die Induzierbarkeit durch ihren Liganden 5'-ppp-RNA wurde in der murinen Pankreaskarzinomzelllinie Panc02 mittels qRT-PCR nachgewiesen. Nach Transfektion mit ppp-mTGF $\beta$  zeigte sich eine deutliche Hochregulation der RIG-I mRNA, was bei Transfektion mit einer Kontroll-RNA ohne die 5'-ppp-Modifikation nicht zu beobachten war. Ferner wurde die Induzierbarkeit von RIG-I und der Helikase MDA5 nach Inkubation mit IFN $\alpha$  gemessen. Auch hier zeigte sich eine deutliche Induktion der RIG-I- bzw. MDA5-Expression (siehe Anhang 8.1.). Diese Ergebnisse lassen auf eine intakte RIG-I-Signalkaskade in den Tumorzellen schließen.



**Abbildung 6: RIG-I Expression und Regulation in Panc02 Pankreaskarzinomzellen.**

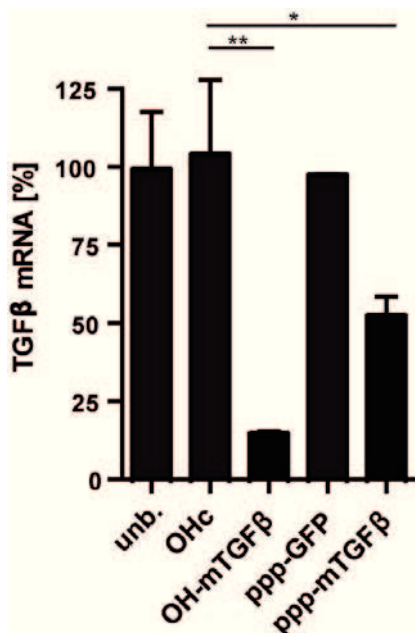
Panc02 Zellen wurden mit OH-RNA (OHc) bzw ppp-mTGF $\beta$  (0,5  $\mu$ g/ml) transfiziert und nach 18 h die relative Menge an RIG-I mRNA bezogen auf die unbehandelte Kontrolle (unb.) mittels qRT-PCR bestimmt. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Ergebnis bestimmt als Duplikat aus insgesamt drei Wiederholungen.

##### 3.1.2. Behandlung von Panc02 Zellen mit bifunktioneller 5'ppp-RNA gegen TGF $\beta_1$

###### 3.1.2.1. Genexpressionshemmung von TGF $\beta_1$

Die Genexpressionshemmung durch unmodifizierte und modifizierte siRNA wurde in Panc02 Zellen nachgewiesen. Sowohl die Behandlung mit ppp-mTGF $\beta$  als auch mit einfacher siRNA ohne Modifikation gegen murines TGF $\beta_1$  (OH-mTGF $\beta$ ) zeigte eine deutliche Reduktion der TGF $\beta_1$  mRNA Spiegel (**Abbildung 7**). Die Effizienz betrug 80% für OH-mTGF $\beta$ , hingegen konnte mit ppp-mTGF $\beta$  nur eine Effizienz von 50% erreicht werden. Die Transfektion mit einer unspezifischen Kontrollsequenz mit oder ohne

Triphosphatmodifikation hatte keinen Einfluss auf die Expression der TGF $\beta_1$  mRNA. Eine mögliche Erklärung für die geringere Effektivität der ppp-mTGF $\beta$  im Vergleich zur unmodifizierten OH-mTGF $\beta$  ist eine geringe Ausbeute an siRNA mit genexpressionshemmender Wirkung durch die *in vitro* Transkription mittels T7-Polymerase.

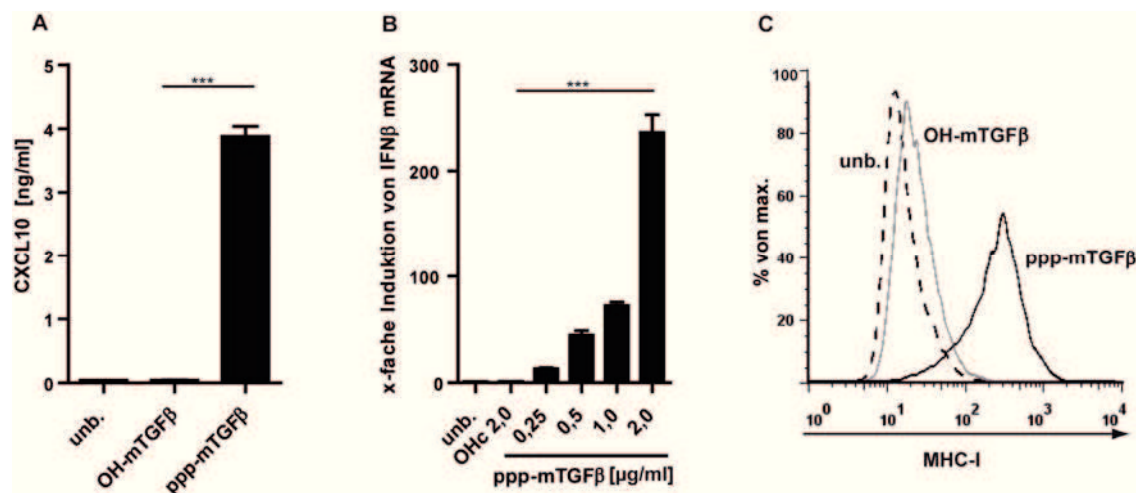


**Abbildung 7: siRNA-vermittelte Genexpressions-Hemmung von murinem TGF $\beta_1$ .**

Panc02 Zellen wurden mit den angegebenen siRNA zweimal im Abstand von 24 h transfiziert (1  $\mu$ g/ml). 18 h nach der zweiten Transfektion wurde die relative Menge an TGF $\beta_1$  mRNA mittels qRT-PCR bestimmt. Gezeigt sind Mittelwerte eines repräsentativen Ergebnisses bestimmt als Duplikat aus drei unabhängigen Wiederholungen.

### 3.1.2.2. Immunstimulation durch ppp-mTGF $\beta$

Im nächsten Schritt wurde die immunstimulatorische Komponente der Triphosphat-modifizierten siRNA untersucht. Nach Transfektion mit ppp-mTGF $\beta$  sezernierten die Karzinomzellen das Chemokin CXCL10 (**Abbildung 8A**). Zudem wurde eine dosisabhängige Produktion von IFN $\beta$  (**Abbildung 8B**) und eine Hochregulation von MHC-I auf der Zelloberfläche beobachtet (**Abbildung 8C**).



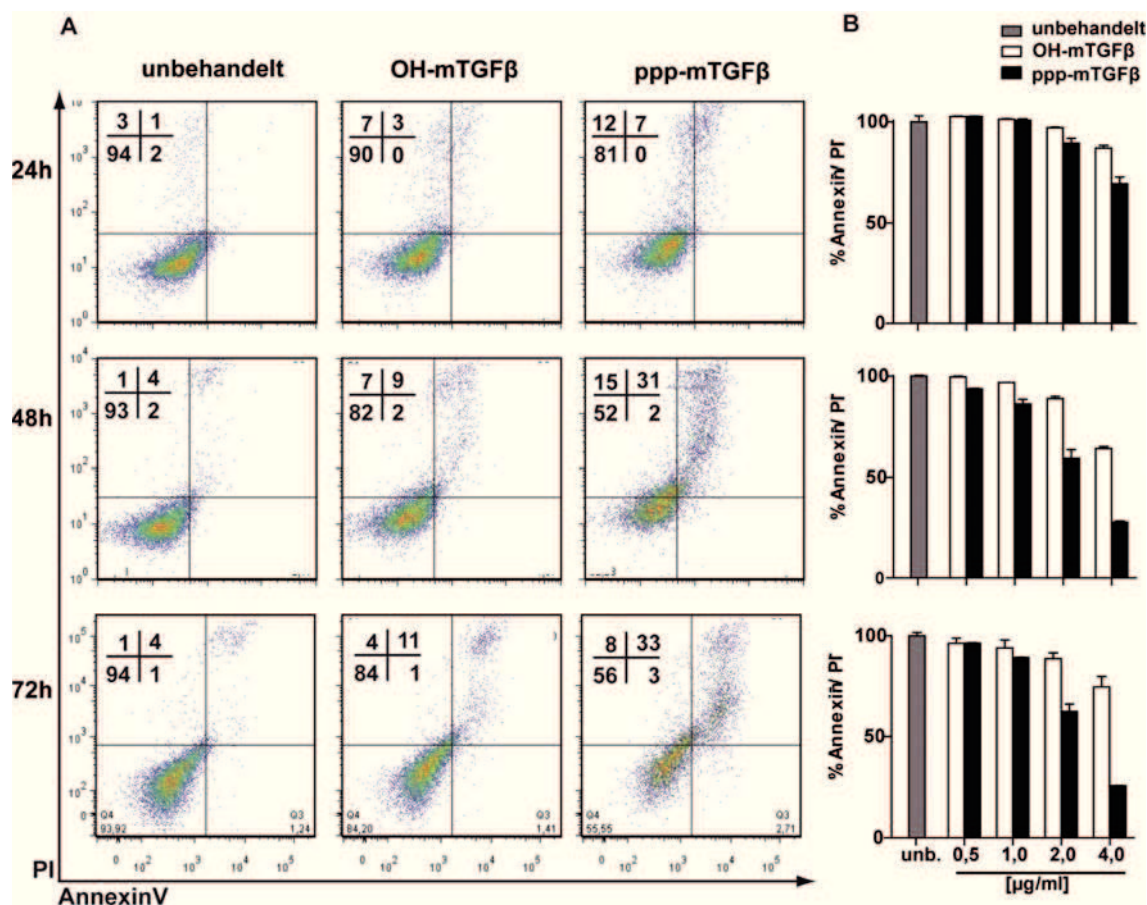
**Abbildung 8: Immunstimulatorische Effekte durch Transfektion mit ppp-mTGFβ.**

(A) 48 h nach der Transfektion mit 1 μg/ml siRNA wurde CXCL10 aus dem Überstand mittels ELISA quantifiziert. (B) Panc02 Zellen wurden mit den angegebenen Mengen an RNA transfiziert und nach 18 h die relative Menge an IFNβ mRNA im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle mittels qRT-PCR bestimmt. (C) Panc02 Zellen wurden mit 1 μg/ml ppp-mTGFβ (schwarze Linie) bzw. OH-mTGFβ (hellgraue Linie) transfiziert und nach 24 h die Expression von MHC-I (H-2K<sup>b</sup>) durchflusszytometrisch bestimmt (gestrichelte Linie: unbehandelte Kontrolle). Die Abbildungen zeigen repräsentative Ergebnisse aus zwei bis drei unabhängigen Versuchen.

### 3.1.2.3. Zeit- und Dosisabhängigkeit der Apoptoseinduktion durch ppp-mTGFβ

Ein weiterer RIG-I-vermittelter Effekt nach Transfektion mit 5'-ppp-RNA ist die Induktion von Apoptose (Besch, Poeck et al. 2009). Daher wurde die Apoptoserate der mit siRNA transfizierten Pankreaskarzinomzellen bestimmt. Panc02 Zellen wurden mit steigenden Konzentrationen (0,5 bis 4 μg/ml) OH-mTGFβ oder ppp-mTGFβ transfiziert und mittels Annexin V/ PI die Vitalität nach 24, 48 und 72 h bestimmt. **Abbildung 9** zeigt beispielhaft die Dotplot-Analyse der Annexin V/PI-Färbung bei einer Konzentration von 2 μg/ml RNA (**A**) sowie die entsprechenden Titrationen relativ zur unbehandelten Kontrolle (**B**).





**Abbildung 9: Apoptoseinduktion durch Transfektion mit ppp-mTGFβ.**

Panc02 wurden mit steigenden Konzentrationen OH-mTGFβ bzw. ppp-mTGFβ transfiziert, zu den angegebenen Zeitpunkten mit Annexin V-APC und Propidiumjodid (PI) gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. (A) Repräsentative Dotplot-Analysen zu den angegebenen Zeitpunkten nach Transfektion mit 2 μg/ml RNA (Zahlen innerhalb der Dotplots geben den prozentualen Anteil der Zellen in korrespondierenden Quadranten an). (B) Dosisabhängigkeit der Apoptose nach RNA-Transfektion nach 48 h. Der Graph stellt Mittelwerte der Annexin V-/PI- (vitale) Zellen relativ zur unbehandelten Kontrolle dar. Gezeigt sind Mittelwerte (n=2) eines repräsentativen Versuchs.

24 h nach Transfektion zeigte sich in den hohen Konzentrationen (2 und 4 μg/ml) der ppp-siRNA eine beginnende Apoptose. 48 h nach Transfektion konnte eine Apoptoserate von ca. 40% bei Transfektion mit 2 μg/ml ppp-mTGFβ bestimmt werden. Bei 4 μg/ml siRNA zeigte sich eine Apoptose der Zellen auch durch die Transfektion mit unmodifizierter siRNA, wobei die 5'-ppp-Modifikation stets zu einer Zunahme der Apoptose führte. Alle weiteren Versuche zur Kombinationstherapie wurden daher mit einer Konzentration von 2 μg/ml ppp-siRNA durchgeführt, um unspezifische, transfektionsbedingte Effekte zu minimieren.

### 3.1.3. Sensitivität gegenüber Chemotherapeutika

Zuerst wurde das Ansprechen der murinen Panc02 Tumorzelllinie auf Chemotherapeutika untersucht, die in der Therapie des Pankreaskarzinoms Verwendung finden. Panc02 Zellen wurden dafür mit steigenden Konzentrationen der Zytostatika Gemcitabin, Oxaliplatin und 5-Fluoruracil inkubiert und anschließend in einem Zeitraum von 24 bis 72 h deren Viabilität mittels *Cell Titer Blue* Assay bestimmt (Abbildung 10). Der Wert für logEC75 (entsprechend der Konzentration, bei der noch 75% der Tumorzellen vital waren) wurde als für die Kombinationstherapie gewünschte suboptimale Zytostatikakonzentration definiert. Diese sind für die drei Chemotherapeutika für 24 h und 48 h in Tabelle 13 aufgeführt.

	Gemcitabin	Oxaliplatin	5-Fluoruracil
logEC75 (24 h)	-7,6	-6,2	-6,1
logEC75 (48 h)	-8,2	-6,3	-6,7

Tabelle 13: LogEC75 Werte für drei Chemotherapeutika bei Panc02 Zellen.

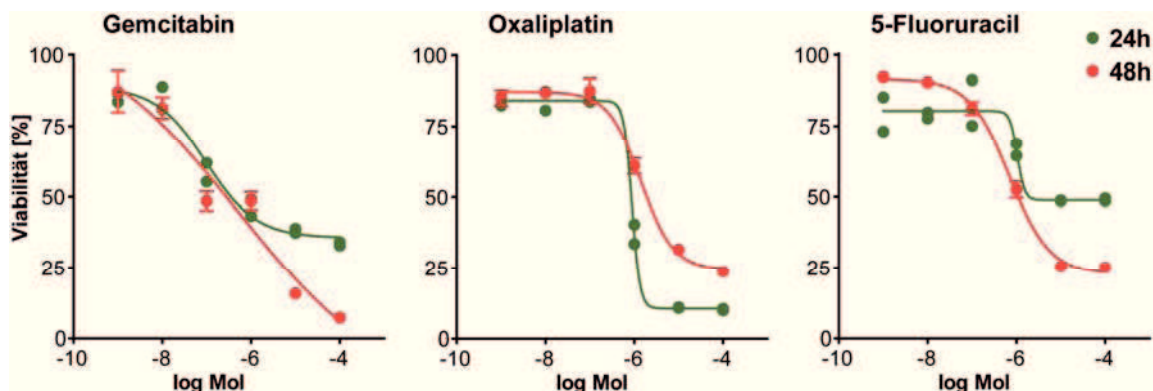


Abbildung 10: Sensitivität von Panc02 Zellen gegenüber Chemotherapeutika.

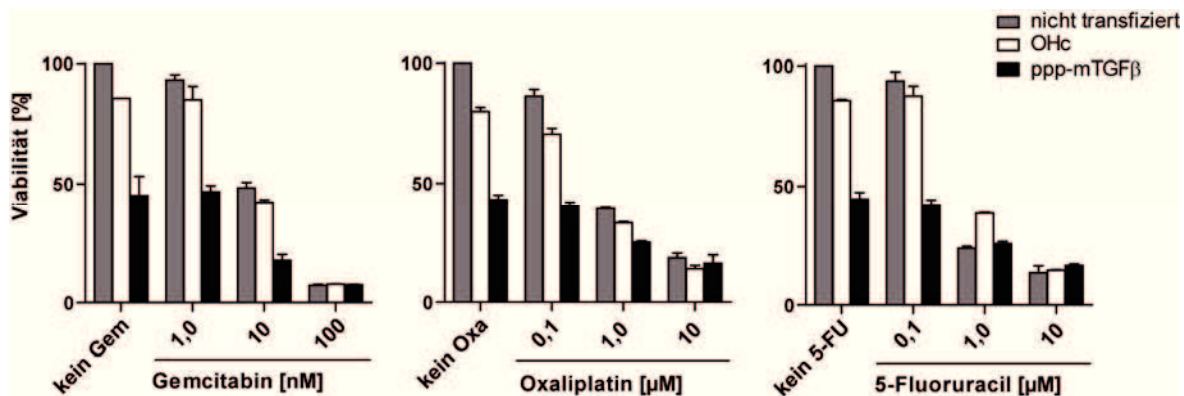
Panc02 wurden mit steigenden Konzentrationen der Zytostatika Gemcitabin, Oxaliplatin und 5-Fluoruracil behandelt (1 nM bis 100 µM). Die Viabilität wurde nach 24 h und 48 h mittels *Cell Titer Blue* Assay bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte aus Triplikaten relativ zur unbehandelten Kontrolle. Die Abbildung zeigt ein Experiment von insgesamt zwei Wiederholungen.

### 3.1.4. Apoptoseinduktion durch die kombinierte Chemoimmuntherapie

In den folgenden Versuchen wurde nun die Apoptoserate der murinen Panc02 Zellen nach Behandlung mit einer kombinierten Chemoimmuntherapie und im Vergleich zu beiden Einzeltherapien untersucht. Zunächst wurden die Zellen mit 2 µg/ml

## Ergebnisse

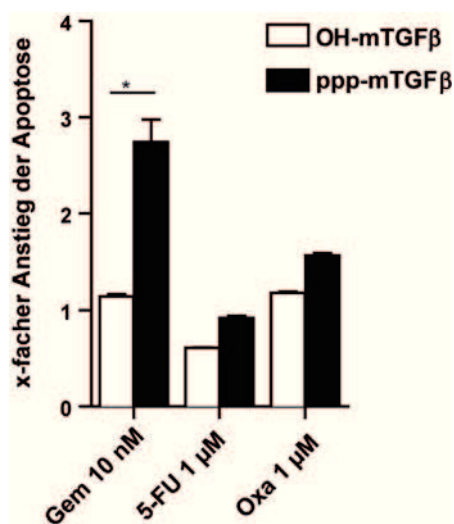
modifizierter bzw. unmodifizierter siRNA in Kombination mit den in **3.1.3.** ermittelten suboptimalen Konzentrationen an Chemotherapeutika behandelt und nach 48 h deren Viabilität mittels *Cell Titer Blue Assay* bestimmt (**Abbildung 11**).



**Abbildung 11: Apoptoseinduktion von Panc02 Zellen durch RNA-basierte Chemoimmuntherapie.**

Panc02 Zellen wurden mit 2 µg/ml siRNA transfiziert und in Ab- bzw. Anwesenheit von Zytostatika inkubiert. Die Viabilität wurde nach 48 h mittels *Cell Titer Blue Assay* bestimmt. Die Graphen zeigen Mittelwerte aus Duplikaten relativ zu den unbehandelten, nicht transfizierten Kontrollzellen. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Experiment von insgesamt vier Experimenten.

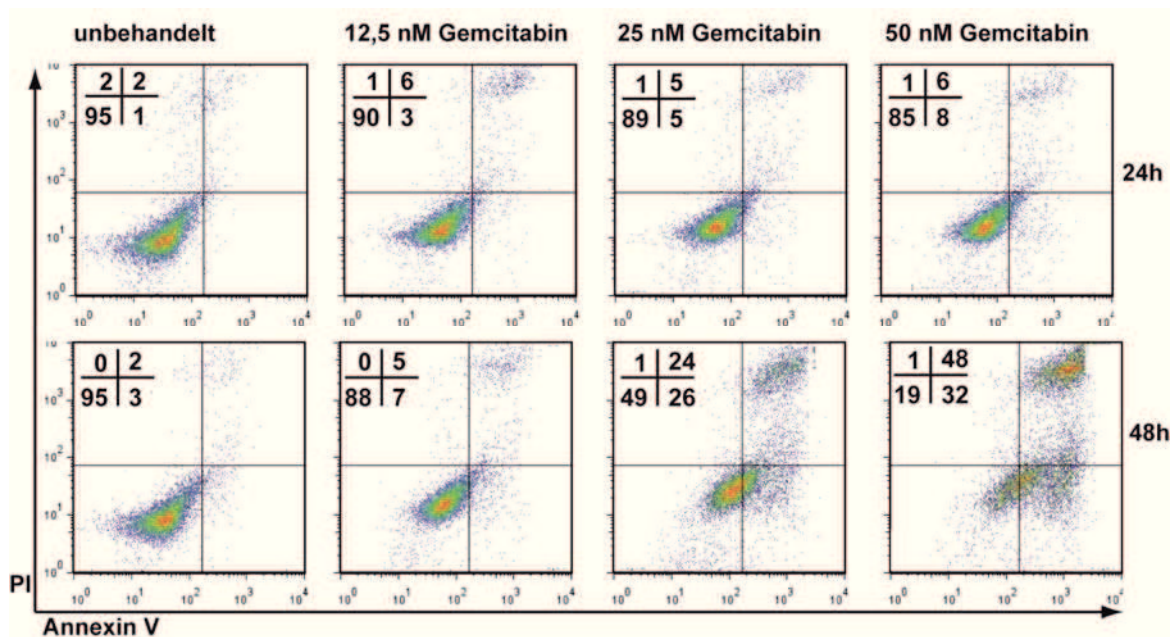
Durch die Transfektion mit ppp-mTGFβ wurde bei 56% der Tumorzellen Apoptose induziert, hingegen hatte die Transfektion mit OH-mTGFβ nur einen geringen Einfluss auf die Zellviabilität (10%). Die Chemotherapie induzierte einen dosisabhängigen zytotoxischen Effekt. Durch die Kombination mit 5-Fluoruracil oder Oxaliplatin konnte durch ppp-mTGFβ keine zusätzliche Erhöhung der Apoptoserate erzielt werden. Anders jedoch bei der kombinierten Gabe von ppp-mTGFβ und Gemcitabin. Bei 10 nM Gemcitabin ließ sich die Zahl der vitalen Zellen von 45% in der ppp-mTGFβ Gruppe und 48% in der Gemcitabin Gruppe auf 18% in der Kombinationsgruppe reduzieren. Somit konnte beim Kombinationspartner Gemcitabin ein fast dreifacher Anstieg der Apoptoserate durch ppp-TGFβ beobachtet werden (**Abbildung 12**). Bei einer Konzentration von 1 nM Gemcitabin ließ sich kein zusätzlicher Effekt beobachten, hingegen erwies sich eine Konzentration von 100 nM Gemcitabin als zu toxisch, um einen zusätzlichen Effekt durch die ppp-RNA erkennen zu können.



**Abbildung 12: Anstieg der Apoptoserate bei kombinierter Gabe von ppp-mTGFβ und Chemotherapeutika.**

Der Graph zeigt den Anstieg der Apoptoserate nach zusätzlicher Transfektion mit siRNA relativ zur alleinigen Zytostatikabehandlung nach 48 h Inkubation (Daten aus obigem Versuch s. Abb. 11). Gezeigt sind Mittelwerte aus Duplikaten eines repräsentativen Experiments aus insgesamt vier Wiederholungen.

Nach Erhalt der Dosiswirkungskurve wurde im nächsten Schritt der suboptimale Wirkungsbereich von Gemcitabin detaillierter untersucht (**Abbildung 13**). Dazu wurden Panc02 Zellen mit 12.5, 25 oder 50 nM Gemcitabin inkubiert, jeweils nach 24 und 48 h mit Annexin V/ PI gefärbt und die Apoptoserate durchflusszytometrisch bestimmt. Nach 24 h ließ sich kein relevanter Unterschied in der Vitalität der Zellen durch die Behandlung mit den drei Gemcitabinkonzentrationen erkennen. Hingegen zeigte sich nach 48 h eine deutliche Reduktion der Zellvitalität auf 88% durch 12.5 nM, 49% durch 25 nM und 19% durch 50 nM Gemcitabine. In den folgenden Versuchen der kombinierten Chemoimmuntherapie wurde daher die suboptimale Konzentration von 25 nM Gemcitabin verwendet.

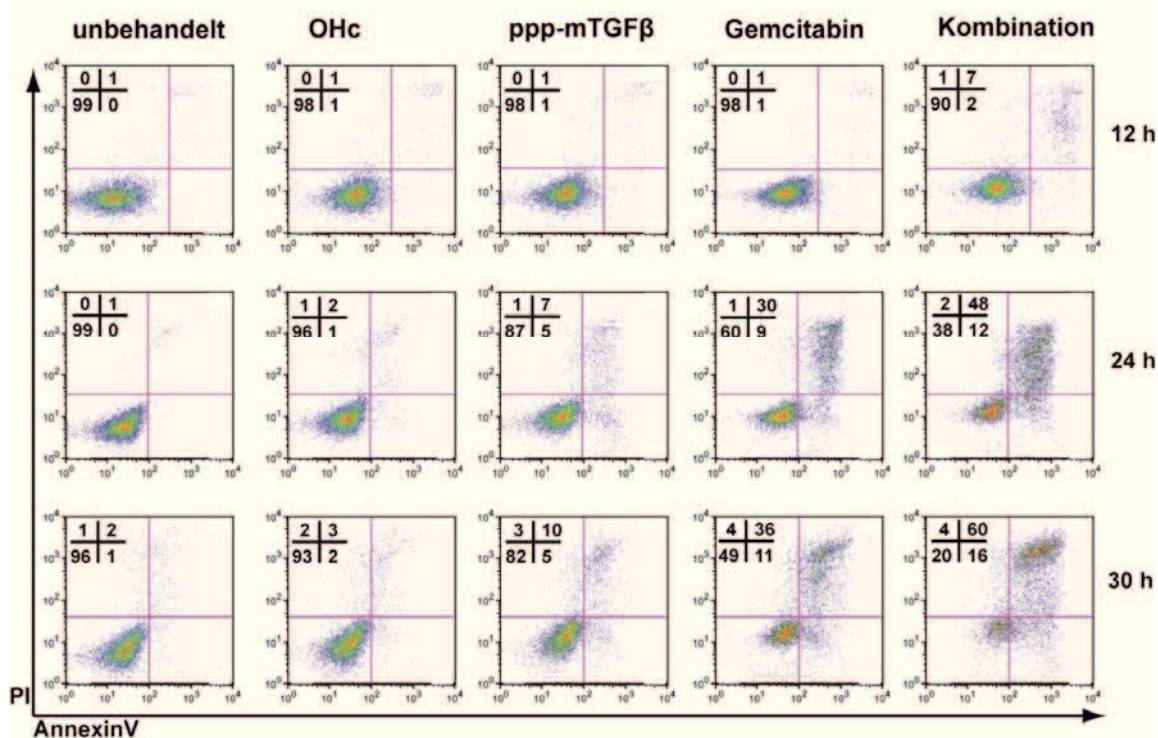


**Abbildung 13: Apoptoseinduktion von Panc02 Zellen im suboptimalen Wirkungsbereich von Gemcitabin.**

Panc02 Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen Gemcitabin inkubiert, nach 24 h und 48 h geerntet und mittels Annexin V/PI-Färbung die Apoptoserate der Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. Die Abbildung zeigt repräsentative Dotplots eines Experiments mit jeweils zwei Ansätzen pro Bedingung.

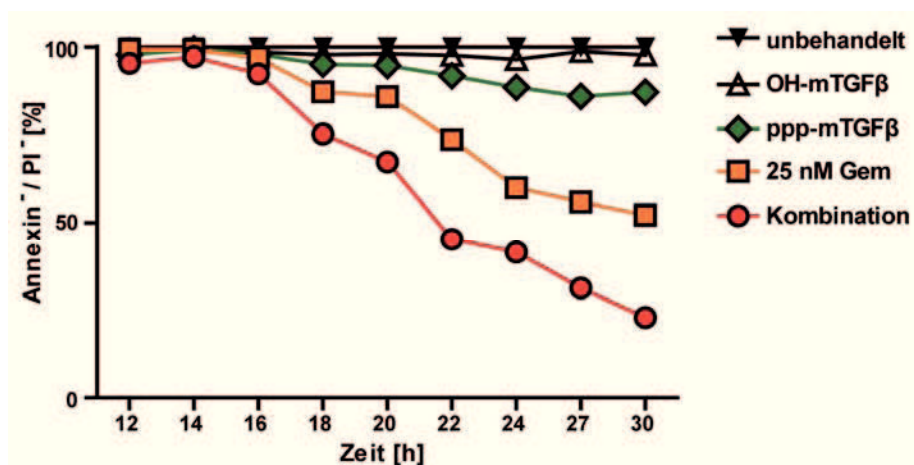
Um den zeitlichen Verlauf der Apoptose durch die Kombinationstherapie zu untersuchen, wurden Panc02 Zellen mit einer Kombination aus 2 µg/ml ppp-mTGFβ und 25 nM Gemcitabin behandelt und die Apoptoserate zwischen 12 und 30 h bestimmt. **Abbildung 14 A** zeigt repräsentative Dotplot-Analysen zu drei ausgewählten Zeitpunkten. Bereits 12 h nach kombinierter Therapie ließ sich eine Abnahme der Zellviabilität in der Kombinationsgruppe erkennen, wohingegen in den Gruppen der Einzelbehandlungen noch keine apoptotischen Zellen zu finden waren. Dieser Effekt in der Kombinationsgruppe konnte bis zu 30 h beobachtet werden (**Abbildung 14 B**).





**Abbildung 14 A: Apoptose von Panc02 Zellen bei RNA-basierter Chemoimmuntherapie.**

Panc02 Zellen wurden mit 2 µg/ml siRNA transfiziert und/ oder mit 25 nM Gemcitabin behandelt. Die Karzinomzellen wurden im angegebenen Zeitraum von 12 bis 48 h nach Behandlung alle zwei bis drei Stunden geerntet und die Apoptoserate mittels Annexin V/ PI Färbung ermittelt. (A) Repräsentative Dotplots der Zeitpunkte 12, 24 und 30 h nach Chemoimmuntherapie von zwei unabhängigen Versuchen.

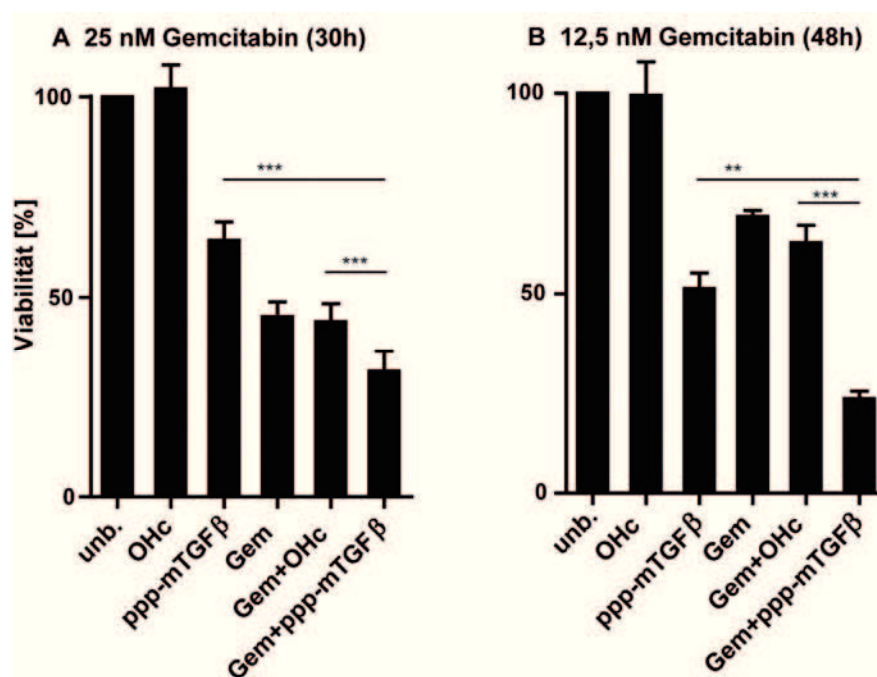


**Abbildung 14 B: Zeitverlauf der Apoptose von Panc02 Zellen induziert durch RNA-basierte Chemoimmuntherapie.**

Der Graph stellt Mittelwerte aus Duplikaten der vitalen Zellen (Annexin V-/ PI-) bezogen auf die unbehandelte Kontrolle im gesamten Zeitverlauf dar.

## Ergebnisse

Zusätzlich wurde als alternative Methode mittels *Cell Titer Blue* Assay die Vitalität der Karzinomzellen nach Chemoimmuntherapie bestimmt (**Abbildung 15**). 30 h nach Behandlung ließ sich der größte zusätzliche Effekt auf die Apoptose beobachten. Die Vitalität wurde durch Kombination aus 2 µg/ml ppp-TGFβ und 25 nM Gemcitabin auf 31% bezogen auf die unbehandelte Kontrolle reduziert (**A**). Ein ähnlicher Effekt konnte bei Reduktion der Gemcitabin-Konzentration auf 12.5 nM beobachtet werden. Nach 48 h sank die Vitalität auf 24% durch die Chemoimmuntherapie, verglichen mit einer Reduktion der vitalen Zellen auf 70% in der Gemcitabin-Gruppe und 51% in der ppp-siRNA-Gruppe (**B**). Somit konnte im suboptimalen Therapiebereich von 12.5 und 25 nM Gemcitabin ein additiver Effekt beobachtet werden.



**Abbildung 15:** Einfluss der RNA-basierten Chemoimmuntherapie auf die Tumorzellvitalität im *Cell Titer Blue* Assay.

Panc02 Zellen wurden mit 2 µg/ml der angegebenen siRNA transfiziert und in Ab- bzw. Anwesenheit von 25 nM Gemcitabin (A) bzw. 12.5 nM Gemcitabin (B) kultiviert. Die Viabilität wurde nach 30 h bzw. 48 h mittels *Cell Titer Blue* Assay bestimmt (unb.: unbehandelte Kontrolle). Gezeigt sind Mittelwerte aus Duplikaten eines repräsentativen Versuchs.

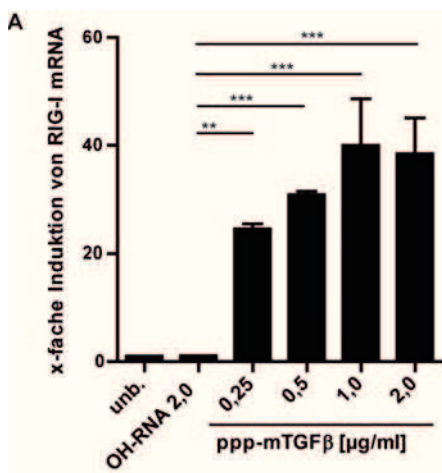
### 3.1.5. Mechanismus der verstärkten Apoptoserate durch Gemcitabinbehandlung

In den vorausgegangenen Experimenten konnte eine verstärkte Apoptoserate durch Gemcitabin-basierte Chemoimmuntherapie in murinen Pankreaskarzinomzellen gezeigt werden. Hieraus stellt sich die Frage, über welchen molekularen Mechanismus dieser additive Effekt bewirkt wird. Hierzu wurden zwei Ebenen betrachtet:

- a) Einfluss der Chemoimmuntherapie auf die Expression von RIG-I
- b) Einfluss der Chemoimmuntherapie auf die Expression pro- und anti-apoptotischer Moleküle der Bcl-2 Familie

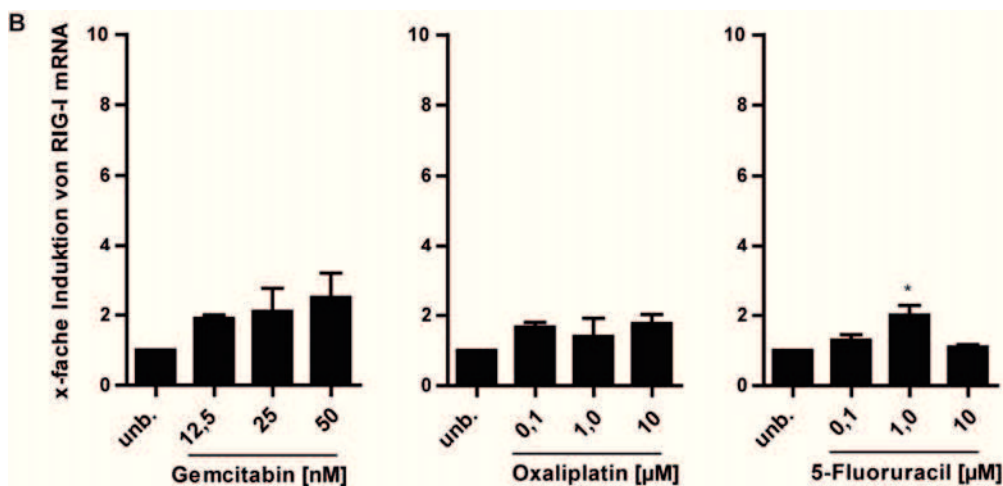
### 3.1.5.1. Expression von RIG-I nach Behandlung mit ppp-mTGF $\beta$ oder Chemotherapie

Mittels quantitativer *Real Time*-PCR wurde zunächst die Induktion von RIG-I, dem zytosolischen Rezeptor der 5'-Triphosphat-siRNA, zum einen durch ppp-mTGF $\beta$  selbst sowie durch die Gabe von Gemcitabin, Oxaliplatin und 5-Fluoruracil getestet (**Abbildung 16**). Wie bereits in **Abbildung 6** gezeigt, resultiert die Transfektion mit ppp-mTGF $\beta$  in einer dosisabhängigen Hochregulation der RIG-I Expression (**A**). Hingegen zeigte die Behandlung mit den Chemotherapeutika Gemcitabin, Oxaliplatin und 5-Fluoruracil keinen relevanten Einfluss auf die RIG-I- Expression (**B**). Somit kann der synergistische Effekt der Chemoimmuntherapie nicht auf eine Chemotherapie-induzierte RIG-I Induktion zurückgeführt werden.



**Abbildung 16: Einfluss von immunaktiver RNA und Chemotherapeutika auf die RIG-I Expression von Panc02 Zellen.**

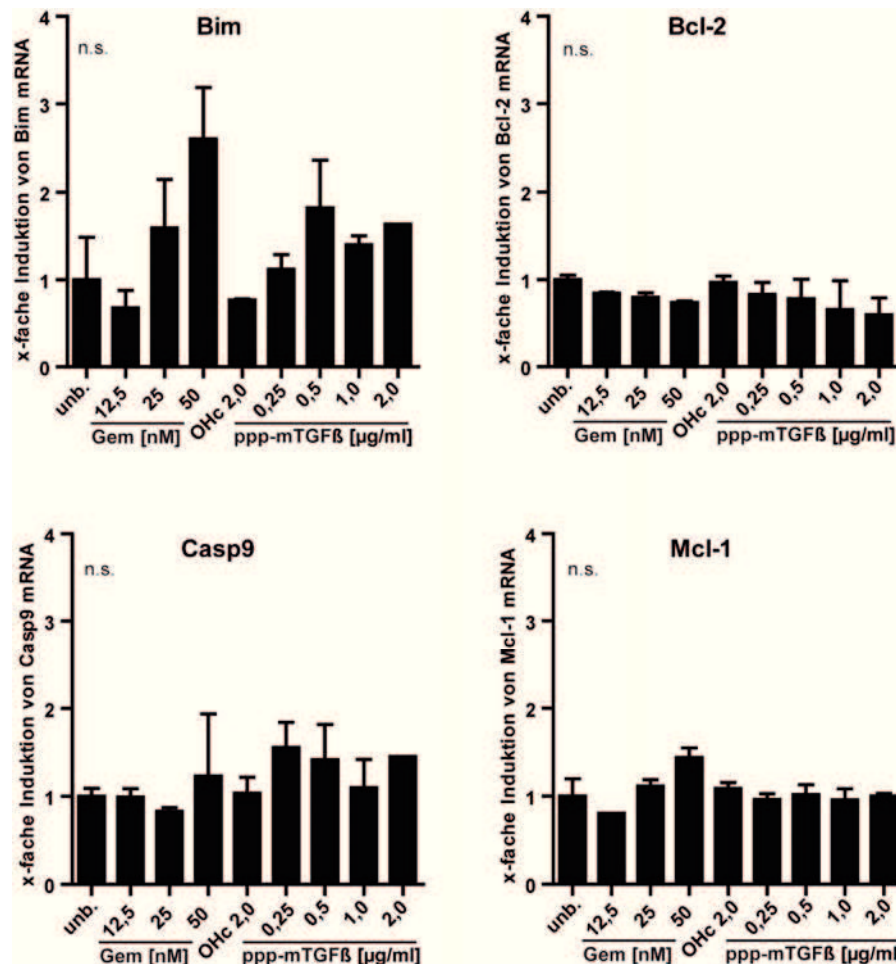
18 h nach Transfektion mit OH-RNA (OHc) bzw. ppp-mTGF $\beta$  (A) oder Behandlung mit den Zytostatika Gemcitabin, Oxaliplatin und 5-FU (B) wurde die relative Expression von RIG-I mRNA bezogen auf die unbehandelte Kontrolle (unb.) mittels qRT-PCR bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte aus Duplikaten.





### 3.1.5.2. Expression der pro-apoptotischen Moleküle Puma und Noxa durch Transfektion mit ppp-mTGF $\beta$

Zunächst wurde die Expression verschiedener pro- sowie antiapoptotischer Proteine nach Transfektion mit ppp-mTGF $\beta$  bzw. Behandlung mit Gemcitabin in Panc02 Zellen untersucht.

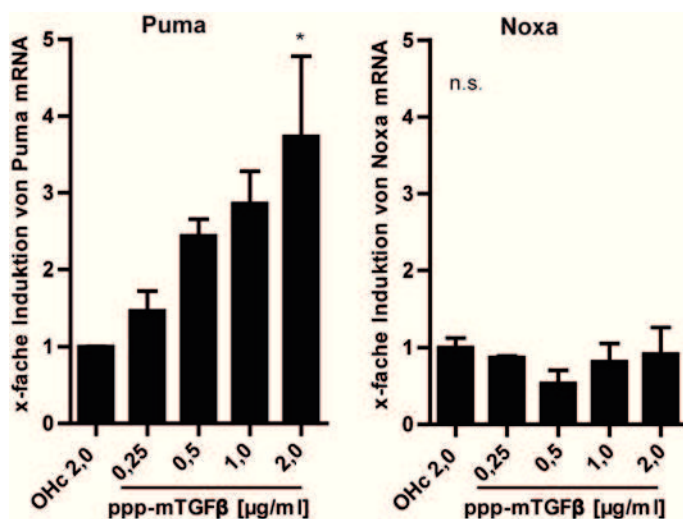


**Abbildung 17: Expression proapoptotischer Proteine in Panc02 Zellen nach Gemcitabin bzw. ppp-mTGF $\beta$  Behandlung.**

Panc02 Zellen wurden mit steigenden Konzentrationen ppp-mTGF $\beta$  bzw. Gemcitabin behandelt und nach 18 h die relative Expression verschiedener Proteine mittels qRT-PCR gemessen. Als Kontrollen dienten unbehandelte Zellen sowie eine Transfektion mit 2,0  $\mu$ g/ml OH-RNA (OHc). Gezeigt sind Mittelwerte aus Duplikaten eines Experiments aus zwei unabhängigen Wiederholungen.

In den weiteren Experimenten wurde das Augenmerk auf die proapoptotischen Proteine Puma und Noxa gelegt, welche eine zentrale Rolle in der Apoptose vermittelt über die zytosolischen Helikasen RIG-I und MDA5 spielen (Besch, Poeck et al. 2009). Auf mRNA-Ebene konnte in Panc02 Zellen mit der maximal verwendeten

Konzentration von 2  $\mu\text{g/ml}$  ppp-mTGF $\beta$  eine geringe Induktion von Puma, nicht jedoch von Noxa, gezeigt werden (**Abbildung 18**).

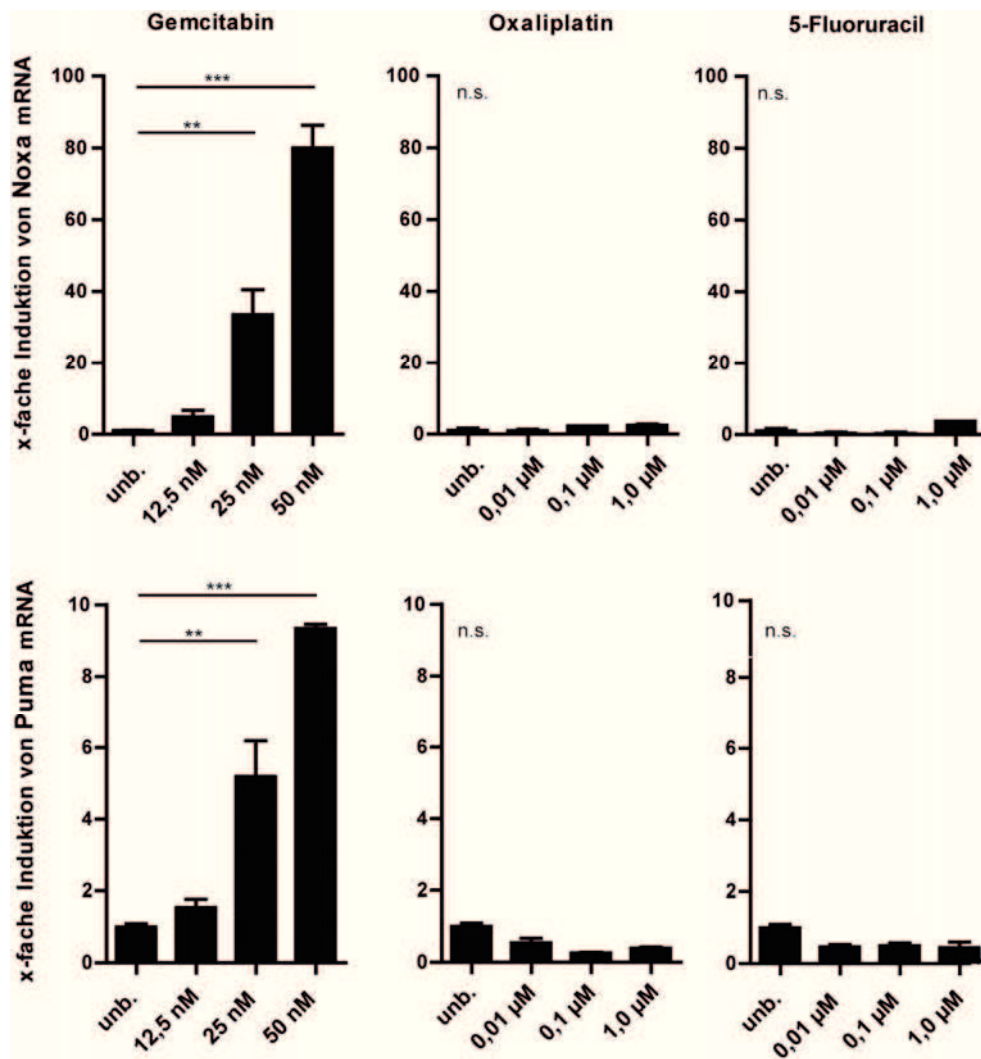


**Abbildung 18: Expression der proapoptotischen Proteine Puma und Noxa nach Behandlung mit ppp-mTGF $\beta$  in Panc02 Zellen.**

18 h nach Transfektion mit den angegebenen Konzentrationen ppp-mTGF $\beta$  wurde die RNA der Tumorzellen isoliert und die relative Menge von Puma bzw. Noxa mRNA im Vergleich zu Zellen, die mit der OH-RNA (OHc) transfiziert wurden, mittels qRT-PCR bestimmt. Gezeigt sind Mittelwerte aus Duplikaten eines Experiments aus zwei unabhängigen Wiederholungen.

### 3.1.5.3. Expression der pro-apoptotischen Moleküle Puma und Noxa durch Behandlung mit Chemotherapeutika

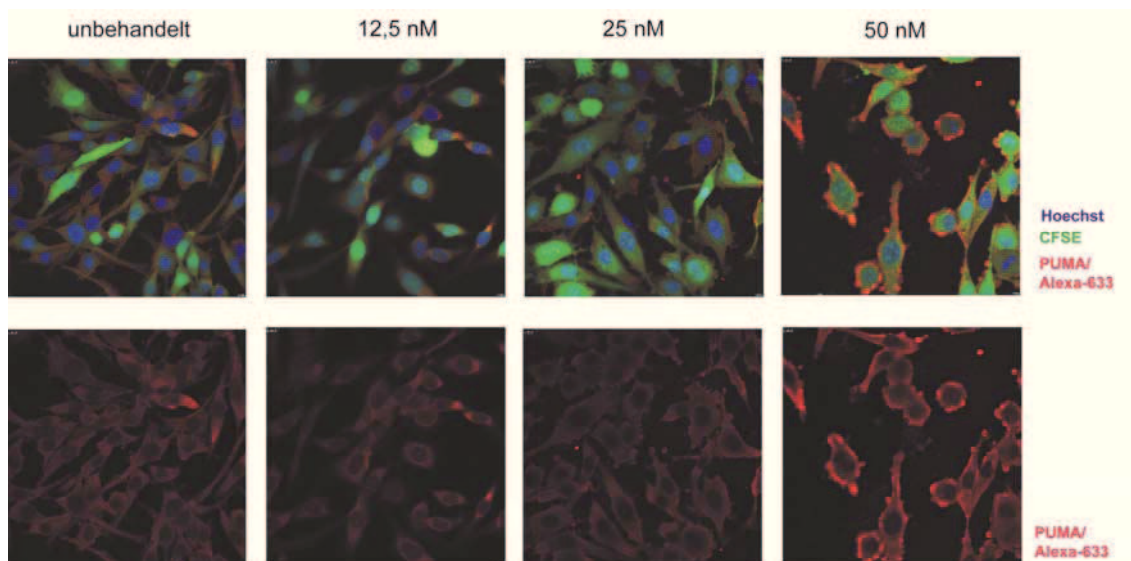
Im nächsten Versuch sollte untersucht werden, ob gegebenenfalls die Behandlung mit Gemcitabin, Oxaliplatin oder 5-Fluoruracil einen Einfluss auf die Expression von Noxa und Puma ausübt. Dabei ließ sich eine dosisabhängige Hochregulation von Noxa und Puma auf mRNA-Ebene induziert durch die Behandlung mit Gemcitabin beobachten (**Abbildung 19**). Oxaliplatin und 5-FU hatten hingegen keinen signifikanten Einfluss auf die Expression von Puma und Noxa.



**Abbildung 19: Expression der proapoptotischen Proteine Noxa und Puma in Panc02 Zellen nach Behandlung mit Chemotherapeutika.**

18 h nach Inkubation mit den Chemotherapeutika Gemcitabin, Oxaliplatin und 5-FU in den angegebenen Konzentrationen wurde die RNA der Tumorzellen isoliert und die relative mRNA Expression von Noxa bzw. Puma im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (unb.) mittels qRT-PCR bestimmt. Die Abbildung zeigt Mittelwerte aus Duplikaten eines repräsentativen Ergebnisses aus zwei unabhängigen Wiederholungen.

Um diesen Effekt auch auf Proteinebene nachzuweisen, wurde eine immunhistochemische Färbung von Puma etabliert. Mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie ließ sich die Akkumulation von Puma in den apoptotischen Körperchen nach Gemcitabin-Behandlung nachweisen (**Abbildung 20**). Eine Immunhistochemie für Noxa ließ sich für Panc02 Zellen nicht etablieren (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 20: Expression von Puma in Panc02 Zellen nach Gemcitabin-Therapie.**

Tumorzellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen Gemcitabin behandelt und die Expression von Puma nach 48 h mittels Immunfluoreszenz nach Färbung mit einem Puma-Alexa633 Antikörper (Anti-PUMA ab9643) untersucht. Die Abbildung zeigt repräsentative Ausschnitte aus Triplikaten von zwei unabhängigen Experimenten.

### 3.2. RNA-basierte Chemoimmuntherapie im Panc02 Mausmodell

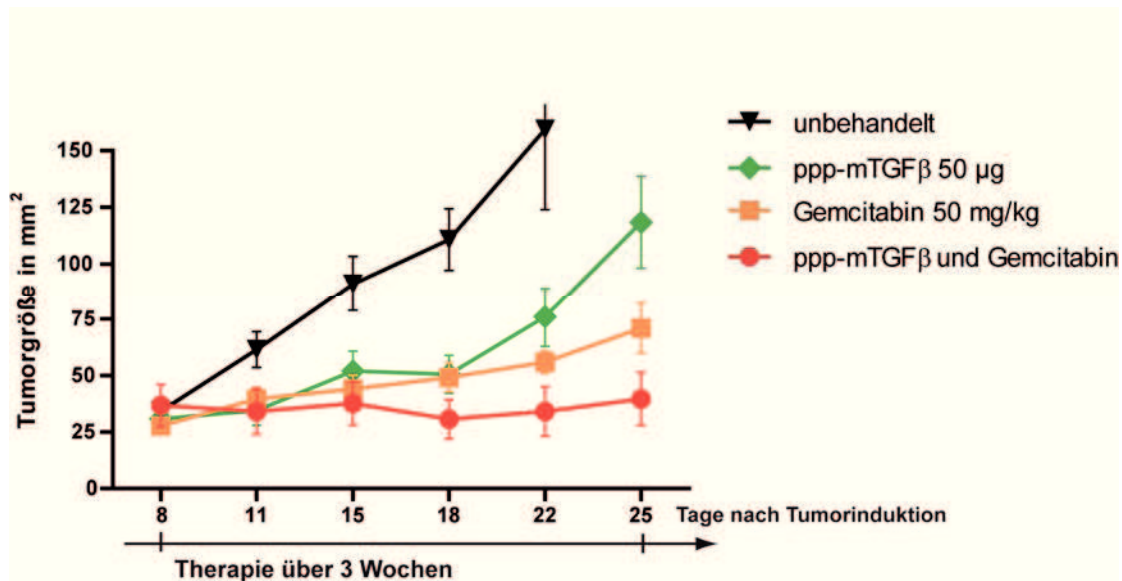
#### 3.2.1. Chemoimmuntherapie im subkutanen Panc02 Mausmodell

Um die Effizienz einer kombinierten Therapie aus 5'-Triphosphat-modifizierter siRNA gegen TGF $\beta_1$  und dem Chemotherapeutikum Gemcitabin im lebenden Organismus zu untersuchen, wurde mit dem subkutanen Panc02 Pankreaskarzinommodell begonnen. Zur Tumorinduktion wurden Panc02 Zellen subkutan in die rechte Flanke von C57BL/6 Mäusen injiziert. Die Therapiegruppen mit je fünf Tieren bestanden aus (1) einer unbehandelten Kontrolle, (2) Gemcitabin (50 mg/kg Körpergewicht i.p.), (3) ppp-mTGF $\beta$  (50  $\mu$ g/Maus i.v.) und (4) einer Kombination aus beidem. Hierbei wurden aufgrund der Erfahrung der Arbeitsgruppe aus vorangegangenen Projekten die angegebenen Dosierungen und Intervalle der Chemotherapie (zweimal wöchentlich) bzw. RNA-basierten Immuntherapie (zweimal wöchentlich) gewählt.

Die Therapie begann am Tag acht nach Tumorinduktion bei einer durchschnittlichen Tumorgroße von 30 mm<sup>2</sup> und wurde über insgesamt drei Wochen zweimal pro Woche durchgeführt. Sowohl ppp-mTGF $\beta$  als auch Gemcitabin führte zu einer Wachstumsverzögerung der Tumore während des Therapiezeitraums (**Abbildung 21**). Die effektivste Tumorkontrolle fand sich in der Kombinationsgruppe mit vollständiger

## Ergebnisse

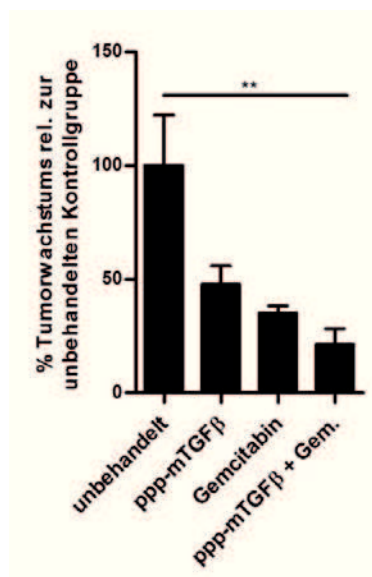
Stagnation des Tumorwachstums während des Behandlungszeitraums. Bei einer der fünf Tiere aus der Kombinationsgruppe kam es zu einer vollständigen und lang anhaltenden Tumorregression (Beobachtungszeitraum 100 Tage).



**Abbildung 21: RNA-basierte Chemoimmuntherapie im subkutanen Panc02 Modell.**

Aufgetragen ist die Tumorgöße der subkutanen Pankreastumore in mm<sup>2</sup>. Die Behandlung begann am Tag 8 nach Tumorinduktion und endete am Tag 25 (n=5 pro Therapiegruppe).

Im Vergleich an Tag 22 nach Tumorinduktion (letzter Zeitpunkt an dem in der Kontrollgruppe die Tiere noch alle lebten) zeigte sich in der Kombinationsgruppe ein signifikant erniedrigtes Tumorwachstum im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Abbildung 22).

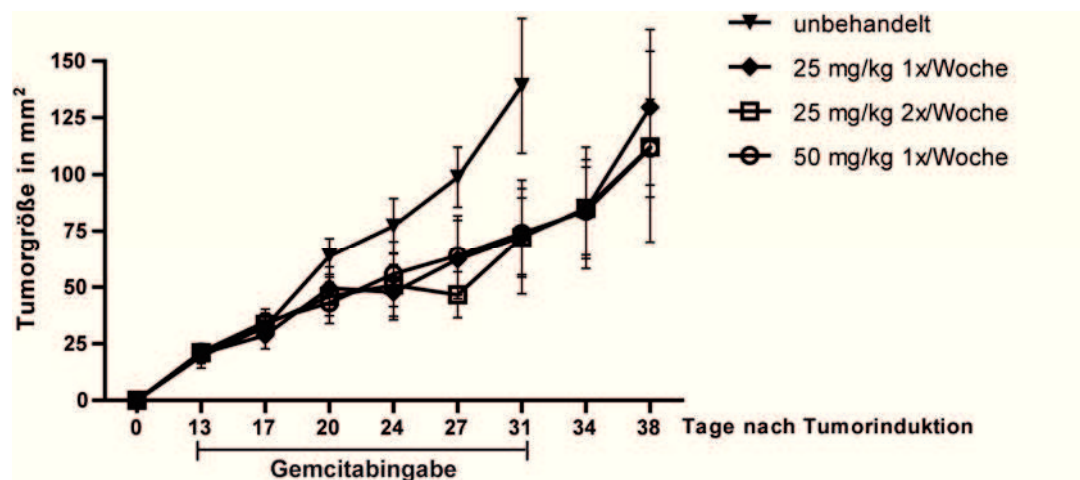


**Abbildung 22: Wachstumskontrolle in den Therapiegruppen am Tag 22 nach Tumorinduktion.**

Aufgetragen ist das Tumorwachstum in Prozent relativ zur unbehandelten Kontrollgruppe an Tag 22 nach Tumorinduktion (n = 5 pro Gruppe).

### 3.2.2. Dosisfindung von Gemcitabin *in vivo*

Da sich im subkutanen Tumorversuch ein relativ ausgeprägter Therapieeffekt durch Gemcitabin Monotherapie zeigte wurde anschließend ein Versuch zur Dosisfindung der Gemcitabinbehandlung durchgeführt. Zwei verschiedene Konzentrationen (50 und 25 mg/kg Körpergewicht) und zwei Intervalle (ein- bzw. zweimal wöchentliche Gabe) wurden getestet. Eine einmal wöchentliche Applikation von 25 mg/kg Gemcitabin war dabei einer Dosis von 50 mg/kg oder zweimaligen Gabe von 25 mg/kg in Bezug auf Kontrolle des Tumorwachstums nicht unterlegen (**Abbildung 23**).



**Abbildung 23: Dosisfindung von Gemcitabin im subkutanen Panc02 Modell.**

Das Wachstum der subkutanen Tumore ist über den Beobachtungszeitraum aufgetragen. Der Zeitraum der Chemotherapie-Applikation lag zwischen Tag 13 und Tag 31 nach Tumorinduktion.

### 3.2.3. Chemoimmuntherapie im orthotopen Panc02 Modell

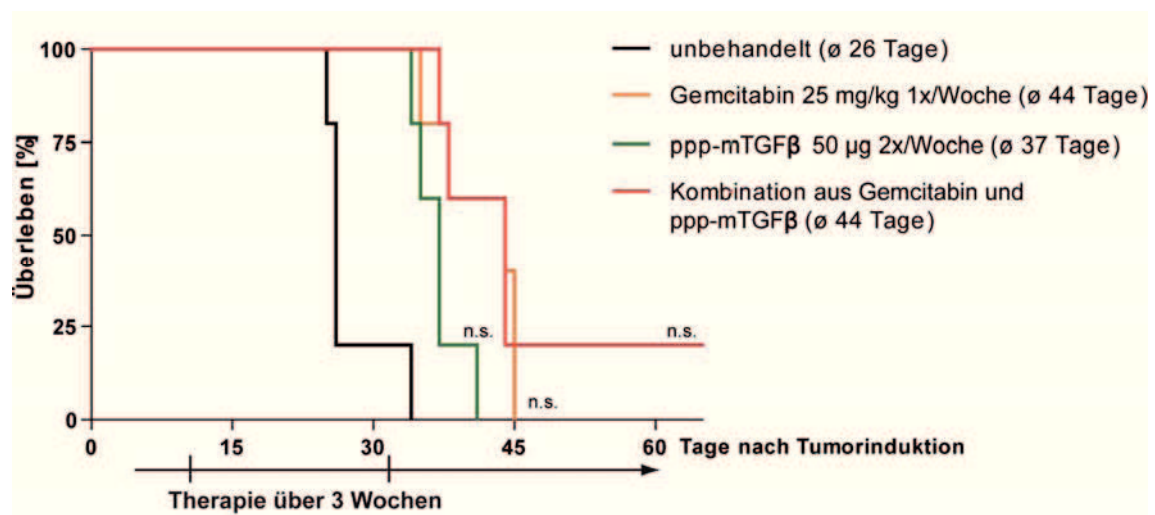
Als nächstes wurde die Effektivität der Chemoimmuntherapie im orthotopen Panc02 Pankreaskarzinommodell untersucht. Auf Grund der Ergebnisse auf das Wachstum subkutaner Tumore wurde für den folgenden Versuch eine Gemcitabindosis von 25 mg/kg Körpergewicht einmal wöchentlich intraperitoneal verabreicht, während die ppp-RNA zweimal wöchentlich intravenös injiziert wurde. Nach Induktion orthotoper Tumore wurden die Mäuse in vier Gruppen á fünf bis sechs Tieren eingeteilt: (1) unbehandelte Kontrollgruppe, (2) Gemcitabin, (3) ppp-mTGF $\beta$  und (4) eine Kombination aus Gemcitabin und ppp-mTGF $\beta$ .

Da im orthotopen Tumormodell eine verlässliche Größenbestimmung der Tumore nicht möglich war, wurde zur Beurteilung der Therapieeffektivität die Überlebenszeit bis zum Eintritt der Abbruchkriterien (Gewichtsverlust >20%, Auftreten von Aszites, auffälliges



## Ergebnisse

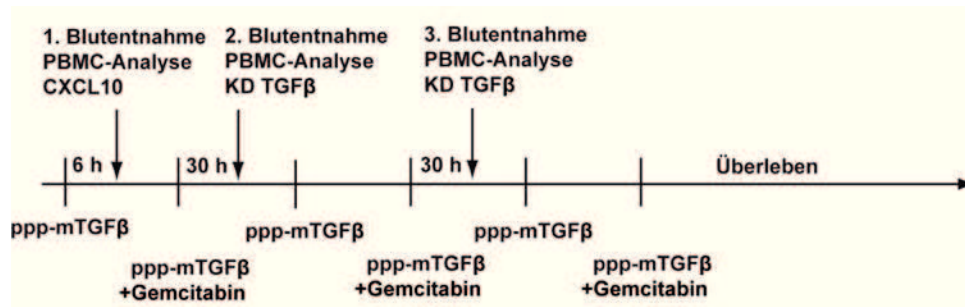
Sozialverhalten, Beeinträchtigung der Mobilität oder verringerte Nahrungs- bzw. Flüssigkeitsaufnahme) gewählt. Bei der Beobachtung des Überlebens der Tiere ergab sich ein medianes Überleben in der unbehandelten Gruppe von 26 Tagen im Vergleich zu 37 Tagen in der ppp-mTGF $\beta$ -behandelten Gruppe. In der Gemcitabin- sowie in der Kombinationsgruppe ergab sich ein medianes Überleben von jeweils 44 Tagen (Abbildung 24). Eine Maus aus der Kombinationsgruppe zeigte unter Chemoimmuntherapie eine komplette Tumorremission über den Behandlungszeitraum hinaus.



**Abbildung 24:** Einfluss der RNA-basierten Chemoimmuntherapie auf das Überleben im orthotopen Panc02 Modell.

Aufgetragen ist das Überleben der Mäuse als Kaplan-Meier-Kurve. Das mediane Überleben der Tiere ist in Klammern in der Legende angegeben (n=5-6 Tiere pro Gruppe).

Um die postulierten Mechanismen der ppp-mTGF $\beta$ -vermittelten Therapie zu evaluieren, wurde der Aktivierungszustand von T-, B- und NK-Zellen im peripheren Blut (CD69-Expression) analysiert, Serumkonzentrationen des Chemokins CXCL10 sowie die Reduktion der TGF $\beta$ -Spiegel bestimmt. **Abbildung 25** bietet eine Übersicht über die durchgeführten Analysen.



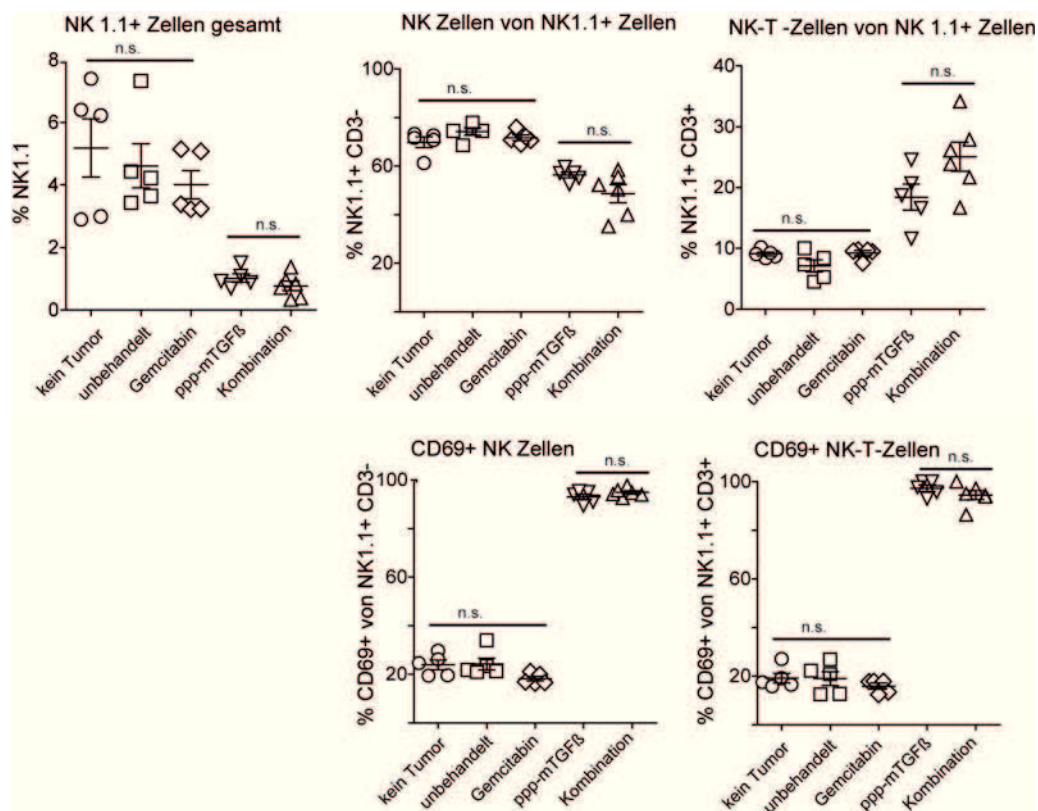
**Abbildung 25: Übersicht über die durchgeführten Analysen im orthotopen Panc02 Modell.**

Dargestellt sind die Zeitpunkte der Blutentnahmen sowie die ausgeführten Analysen im zeitlichen Bezug zu den verabreichten Therapien. KD, *knock down*; PBMC; *peripheral blood mononuclear cells*.

### 3.2.3.1. Analyse der Lymphozyten im peripheren Blut

Der prozentuale Anteil bestimmter Lymphozytenpopulationen sowie deren Aktivierungszustand wurden durchflusszytometrisch analysiert. Die Expression von CD69 wurde als früher Aktivierungsmarker auf den Zellpopulationen bestimmt. Die erste Blutentnahme erfolgte 6 h nach der ersten ppp-mTGFβ-Injektion, d.h. noch vor der ersten Gabe von Gemcitabin. In den Tieren, die mit ppp-mTGFβ behandelt wurden, fand sich eine relative Verminderung der NK-Zellen, wobei der relative Anteil der NKT-Zellen erhöht war. Sowohl NK- als auch NKT-Zellen zeigten nach ppp-mTGFβ-Injektion eine erhöhte CD69-Expression als Zeichen der Aktivierung.

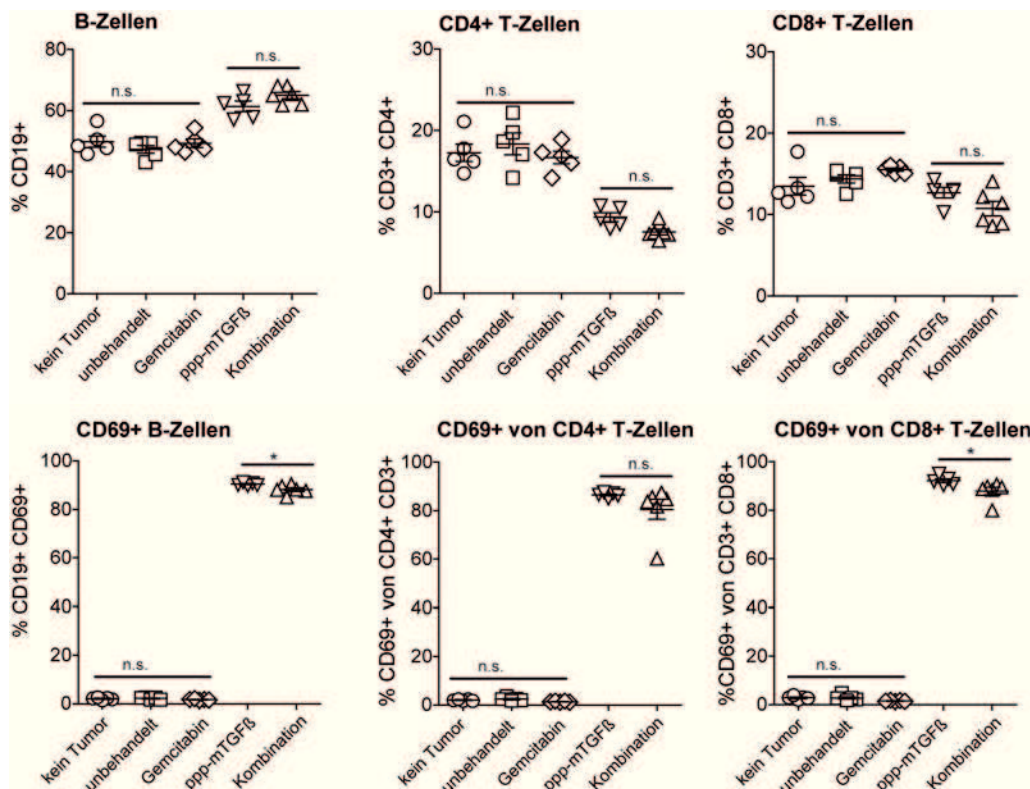




**Abbildung 26: Analyse der Anzahl und Aktivierung von NK- und NKT-Zellen im peripheren Blut bei der ersten Blutentnahme.**

6 h nach der ersten ppp-mTGFβ Injektion, noch vor der ersten Gemcitabin-Gabe, wurde den Mäusen Blut entnommen und durchflusszytometrisch die prozentuale Anzahl und Aktivierung der NK- und NKT-Zellen gemessen (n=5 Tiere pro Gruppe).

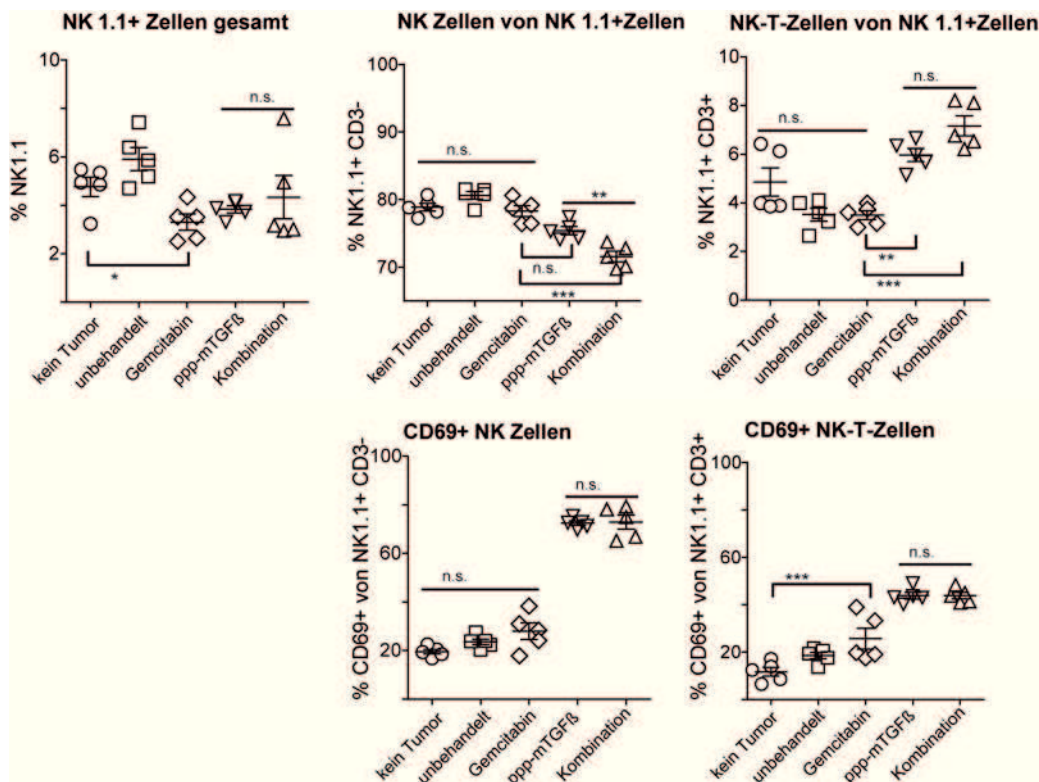
Des Weiteren ließ sich beobachten, dass der relative Anteil der B-Zellen nach Injektion von ppp-mTGFβ leicht erhöht war, wohingegen der Anteil der T-Zellen, vor allem der CD4<sup>+</sup> T-Zellen, deutlich vermindert war gegenüber den unbehandelten bzw. Gemcitabin-behandelten Gruppen. Sowohl B- als auch T-Zellen zeigten eine starke Hochregulation der CD69-Expression durch die Therapie mit ppp-mTGFβ.



**Abbildung 27: Analyse der Anzahl und Aktivierung von T- und B-Lymphozyten im peripheren Blut bei der ersten Blutentnahme.**

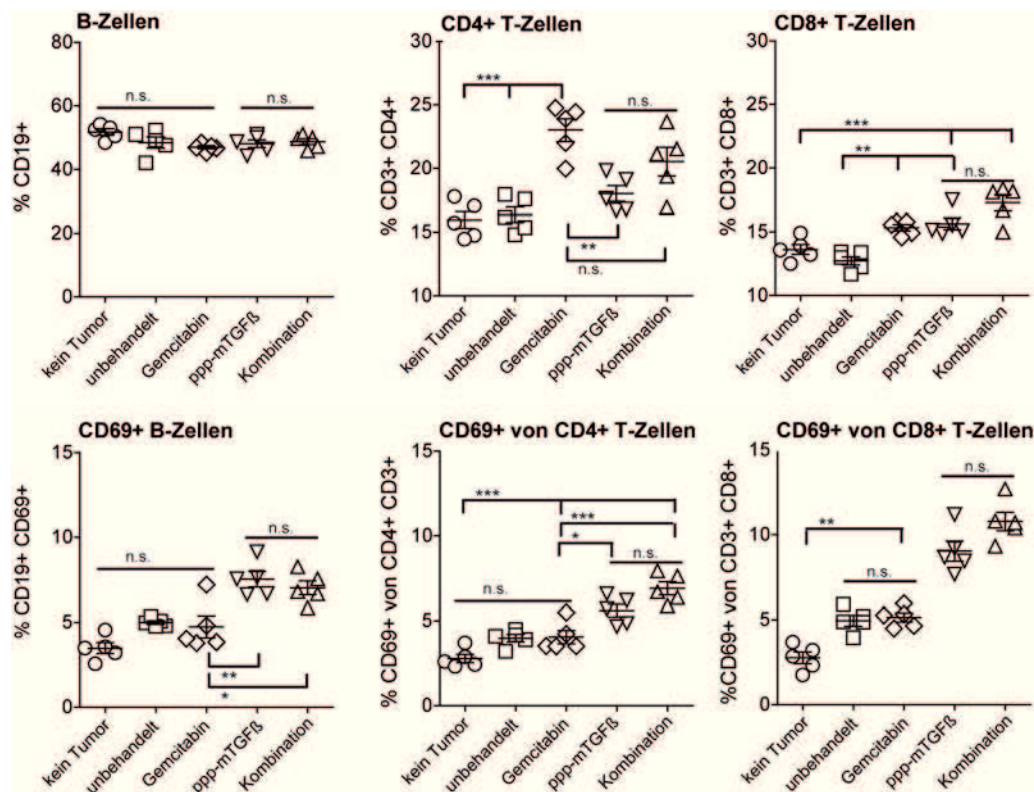
6 h nach der ersten ppp-mTGF $\beta$  Injektion, noch vor der ersten Gemcitabin-Gabe, wurde den Mäusen Blut entnommen und durchflusszytometrisch die prozentuale Anzahl und Aktivierung der CD4 $^{+}$  und CD8 $^{+}$  T-Zellen, sowie der B-Zellen gemessen (n=5 Tiere pro Gruppe).

Die nächste Blutentnahme erfolgte 30 h nach der zweiten ppp-mTGF $\beta$ -Injektion bzw. 30 h nach der ersten Gemcitabin-Gabe. Der relative Anteil der NKT-Zellen blieb in den Gruppen erhöht, die ppp-mTGF $\beta$  erhalten hatten. Auch eine verstärkte Expression von CD69 aller NK-Zellen in diesen Gruppen ließ sich weiterhin beobachten. Im Vergleich zur ersten Analyse war der relative Anteil von B-Zellen unbeeinflusst durch die Therapie. Eine Abnahme der CD4 $^{+}$  T-Zellen in den ppp-mTGF $\beta$ -behandelten Gruppen war nicht mehr vorhanden, der Anteil der CD8 $^{+}$  T-Zellen blieb weiterhin unbeeinflusst. Es zeigte sich eine geringer ausgeprägte Expression von CD69 bei B-, CD4 $^{+}$ - und CD8 $^{+}$ -T-Zellen im Vergleich zur ersten Analyse. Insgesamt blieben jedoch die ppp-mTGF $\beta$ -induzierten Veränderungen auch in der Kombinationsgruppe erhalten (Abbildung 28 und Abbildung 29).



**Abbildung 28: Analyse der Anzahl und Aktivierung von NK- und NKT-Zellen im peripheren Blut bei der zweiten Blutentnahme.**

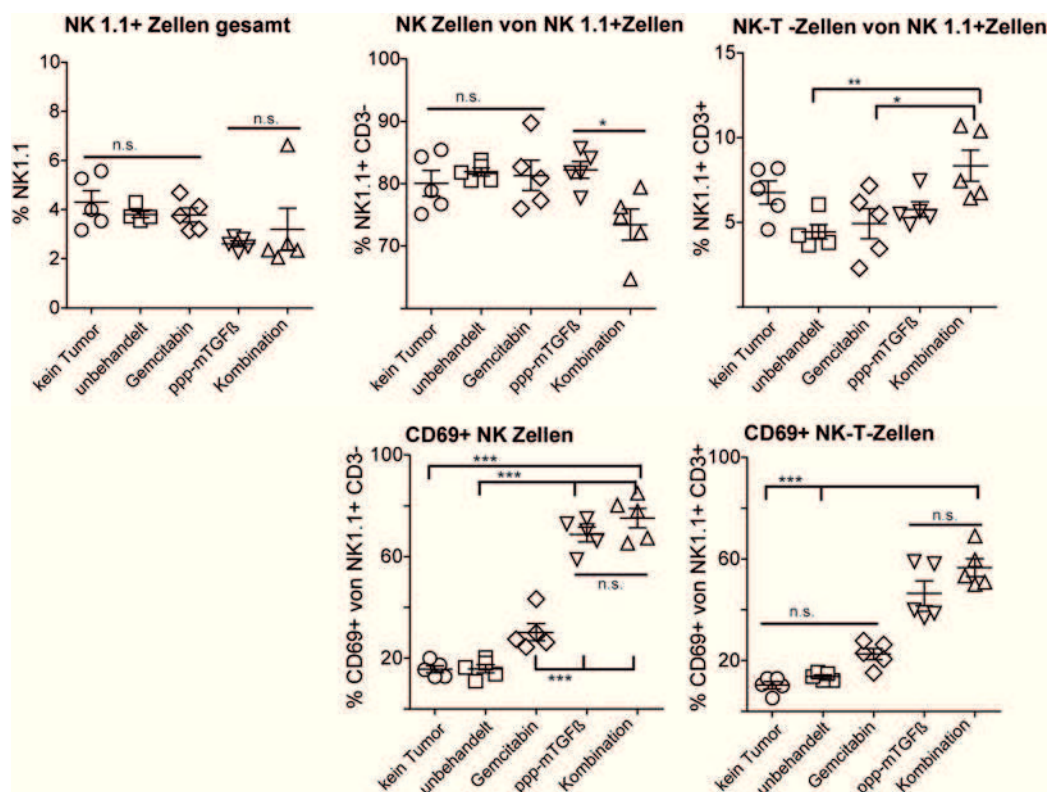
30h nach der zweiten ppp-mTGFβ Injektion bzw. 30 h nach der ersten Gemcitabin-Behandlung wurde den Mäusen Blut entnommen und durchflusszytometrisch die prozentuale Anzahl und Aktivierung der NK- und NKT-Zellen gemessen (n=5 Tiere pro Gruppe).



**Abbildung 29: Analyse der Anzahl und Aktivierung von T- und B-Lymphozyten im peripheren Blut bei der zweiten Blutentnahme.**

30 h nach der zweiten ppp-mTGF $\beta$  Injektion bzw. 30 h nach der ersten Gemcitabin-Gabe wurde den Mäusen Blut entnommen und durchflusszytometrisch die prozentuale Anzahl und Aktivierung der CD4 $^{+}$  und CD8 $^{+}$  T-Zellen, sowie der B-Zellen gemessen (n=5 Tiere pro Gruppe).

Die letzte Blutentnahme erfolgte 30 h nach der vierten RNA-Applikation bzw. 30 h nach der zweiten Gemcitabin-Therapie. Zu diesem Zeitpunkt blieb lediglich in der Kombinationsgruppe die Anzahl der peripheren NK-Zellen erniedrigt, sowie der NKT-Zellanteil erhöht. Des Weiteren konnte eine bestehende Aktivierung der Zellen nach ppp-mTGF $\beta$  sowohl in der Einzeltherapie als auch in der Kombination mit Gemcitabin beobachtet werden (**Abbildung 30**).

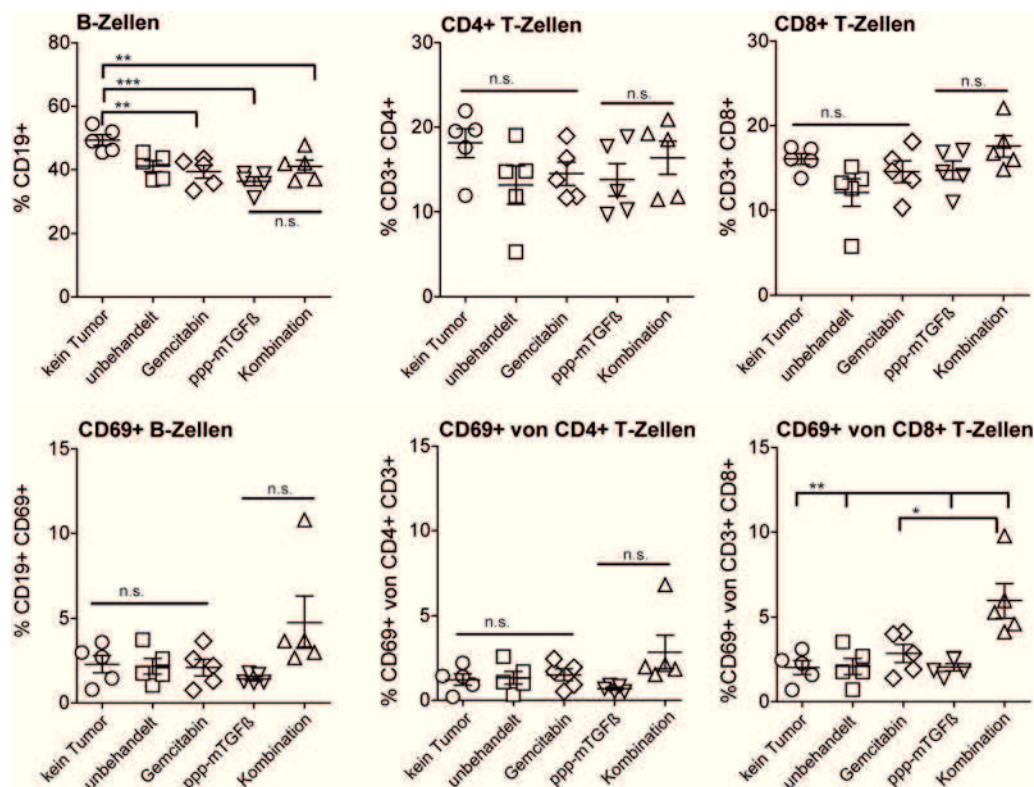


**Abbildung 30: Analyse der Anzahl und Aktivierung der NK- und NKT-Zellen im peripheren Blut bei der dritten Blutentnahme.**

30h nach der vierten ppp-mTGFβ Injektion bzw. 30 h nach der zweiten Gemcitabin-Behandlung wurde den Mäusen Blut entnommen und durchflusszytometrisch die prozentuale Anzahl und Aktivierung der NK- und NKT-Zellen gemessen (n=5 Tiere pro Gruppe).

In der Kombinationsgruppe zeigte sich noch eine Aktivierung von CD8<sup>+</sup> T-Zellen. In den übrigen Populationen zeigten sich keine relevanten Unterschiede zwischen den Gruppen (**Abbildung 31**).



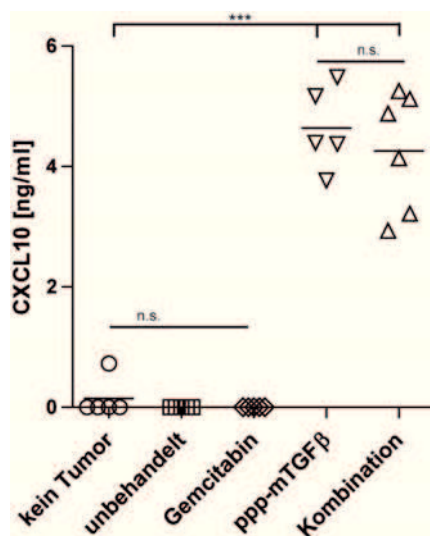


**Abbildung 31: Analyse der Anzahl und Aktivierung von T- und B-Lymphozyten im peripheren Blut bei der dritten Blutentnahme.**

30 h nach der vierten ppp-mTGFβ Injektion bzw. 30 h nach der zweiten Gemcitabin-Gabe wurde den Mäusen Blut entnommen und durchflusszytometrisch die prozentuale Anzahl und Aktivierung der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen, sowie der B-Zellen gemessen (n=5 Tiere pro Gruppe).

### 3.2.3.2. Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen

Um eine systemische Immunaktivierung durch die Applikation von ppp-mTGFβ nachzuweisen wurde 6 h nach der ersten RNA-Injektion den Tieren Vollblut entnommen und die Konzentration von CXCL10 im Serum bestimmt. **Abbildung 32** zeigt eine deutlich erhöhte CXCL10 Serumspiegel im Blut jener Tiere, die eine Injektion von ppp-mTGFβ erhalten hatten, sowohl als Einzeltherapie als auch in der Kombinationstherapie. Eine Behandlung mit Gemcitabin alleine wirkte sich nicht auf die CXCL10 Serumspiegel aus.

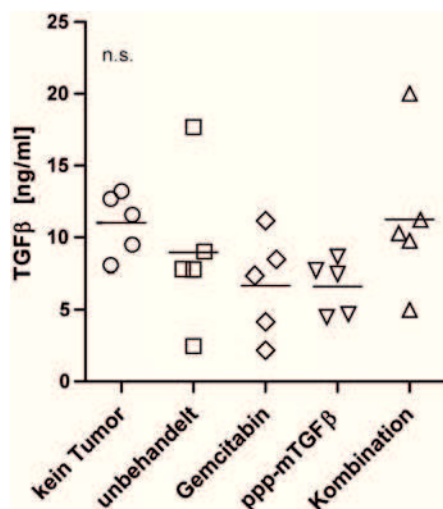


**Abbildung 32: Einfluss der Therapie auf die CXCL10 Serumspiegel.**

6 h nach der ersten RNA-Therapie wurde den Tieren peripheres Blut entnommen und die CXCL10 Serumspiegel mittels ELISA gemessen. Als Kontrollen dienten fünf Mäuse ohne Tumor, sowie fünf Mäuse mit orthotopen Pankreaskarzinomen, die keine Therapie erhalten hatten (n=5 pro Gruppe).

### 3.2.3.3. Einfluss der Therapie auf die TGFβ<sub>1</sub> Serumspiegel

Neben der Immunstimulation wurde auch der siRNA-vermittelte Effekt auf die TGFβ<sub>1</sub> Spiegel im Serum der behandelten Tiere analysiert. Dazu wurde den Tieren 30 h nach der 2. sowie nach der 4. Injektion peripheres Blut entnommen und die Serumkonzentration von TGFβ mittels ELISA quantifiziert. Überraschenderweise fand sich zu diesen Zeitpunkten kein signifikanter Unterschied in der Serumkonzentration von TGFβ zwischen den einzelnen Therapiegruppen (**Abbildung 33**).



**Abbildung 33: Einfluss der Therapie auf die TGFβ Serumspiegel.**

30 h nach der vierten Injektion von ppp-mTGFβ wurde den Tieren peripheres Blut entnommen und TGFβ Serumspiegel mittels ELISA bestimmt. Als Kontrollen dienten fünf Mäuse ohne Tumor, sowie fünf Mäuse mit orthotopen Pankreaskarzinomen, die keine Therapie erhalten hatten (n=5 pro Gruppe).

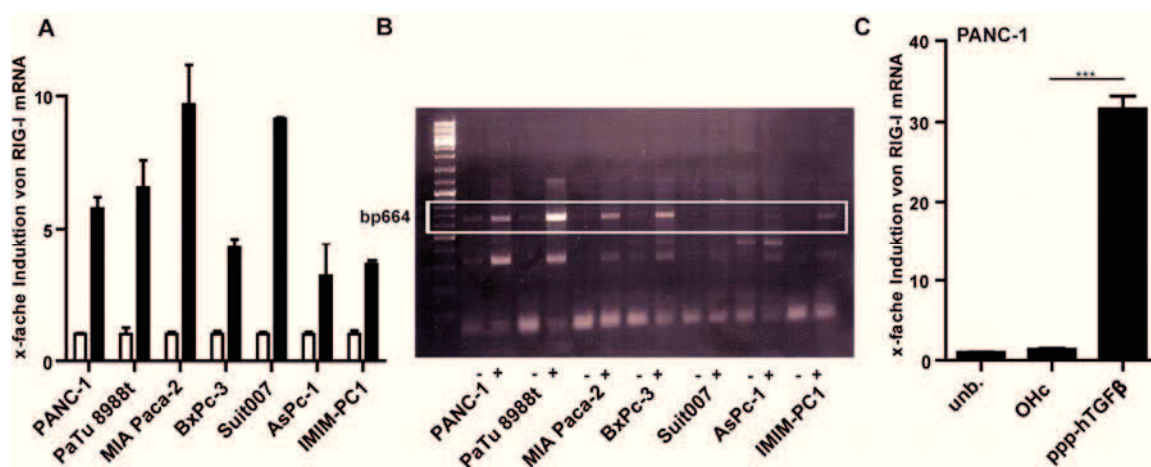
Dieses Ergebnis ist diskrepant zu Voruntersuchungen der Arbeitsgruppe, in denen eine signifikante Reduktion von TGFβ sowohl im Serum als auch im Tumorgewebe nachgewiesen werden konnte (Ellermeier, Wei et al. 2013). Der fehlende *in vivo* Knockdown ist möglicherweise durch die geringere *silencing* Effizienz der für diese Arbeit generierten ppp-mTGFβ siRNA zu erklären (siehe **Abbildung 7**).

### 3.3. RNA-basierte Chemoimmuntherapie humaner Pankreaskarzinomzelllinien

Um die Relevanz der mit der murinen Panc02 Zelllinie gewonnenen Daten auch im humanen System zu überprüfen wurden in den folgenden Experimenten die humanen Pankreaskarzinomzelllinien PANC-1, PaTu 8988t, MIA Paca-2, BxPc-3, Suit007, AsPc-1 und IMIM-PC1 verwendet.

#### 3.3.1. RIG-I Expression in humanen Pankreaskarzinomlinien

Zunächst wurden humane Pankreaskarzinomzelllinien auf ihre Expression von RIG-I analysiert. Dafür wurden die Zellen mit und ohne IFN $\alpha$  Vorstimulation untersucht um eine potenzielle Induktion zu erreichen. In allen getesteten Zelllinien konnte eine Hochregulation von RIG-I nach Zugabe von IFN $\alpha$  beobachtet werden, analog zur Maus-Zelllinie Panc02, wohingegen eine Transfektion mit unspezifischer OH-RNA keine Auswirkungen auf die RIG-I mRNA Expression hatte (**Abbildung 34**).



**Abbildung 34: Expression von RIG-I in humanen Pankreaskarzinomlinien.**

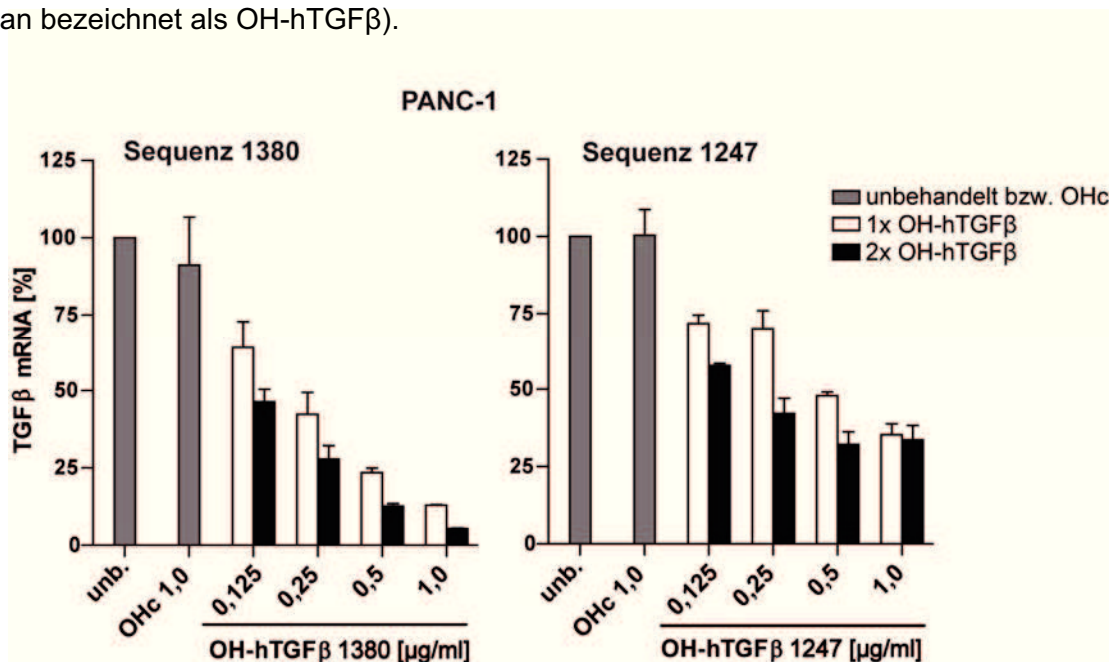
(A) Die humanen Karzinomzelllinien wurden mit 1000 U/ml humanem IFN $\alpha$  inkubiert und nach 18 h die relative Menge an RIG-I mRNA mittels qRT-PCR bestimmt (bezogen auf die unbehandelte Kontrolle, weißer Balken). (B) Darstellung der RIG-I mRNA Expression mittels konventioneller PCR (- unbehandelt, + IFN $\alpha$ ). (C) PANC-1 Zellen wurden mit 2  $\mu$ g/ml OH-RNA (OHc) bzw 1  $\mu$ g/ml ppp-hTGF $\beta$  transfiziert und nach 18 h die relative Menge an RIG-I mRNA bezogen auf die unbehandelte Kontrolle (unb.) mittels qRT-PCR bestimmt. Gezeigt sind jeweils repräsentative Ergebnisse von zwei unabhängigen Experimenten.



### 3.3.2. Einfluss von 5'-modifizierter siRNA gegen TGF $\beta_1$ auf humane Pankreaskarzinomzellen

#### 3.3.2.1. Expressionshemmung von humanem TGF $\beta_1$

Für die Expressionshemmung von humanem TGF $\beta_1$  wurde die Effizienz zweier siRNA-Sequenzen evaluiert (Sequenz 1380 und 1247), die an verschiedenen Stellen der Ziel mRNA angreifen. Der Versuch wurde mit zwei verschiedenen humanen Zelllinien (PANC-1 und PaTu8988) durchgeführt. **Abbildung 35** zeigt repräsentativ für die Ergebnisse beider Zelllinien die Expressionshemmung in der Zelllinie PANC-1. Es konnte für beide Sequenzen eine dosisabhängige Reduktion der TGF $\beta_1$  mRNA beobachtet werden, wobei eine zweifache Transfektion der einfachen überlegen war. Durch zweimalige Transfektion mit 1  $\mu$ g OH-hTGF $\beta$  Sequenz 1380 konnte eine Reduktion der TGF $\beta_1$  mRNA auf 5% bezogen auf die unbehandelte Kontrolle erreicht werden. Da in beiden Zelllinien die Genexpressionshemmung mit der Sequenz 1380 effektiver war, wurde diese Sequenz in den weiteren Versuchen verwendet (von hier an bezeichnet als OH-hTGF $\beta$ ).

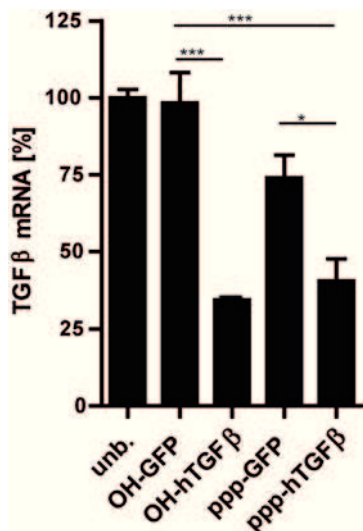


**Abbildung 35: Genexpressionshemmung von TGF $\beta_1$  in PANC-1 Zellen.**

Tumorzellen wurden einmal (weiße Balken) bzw. zweimal (schwarze Balken) im Abstand von 24 h mit der angegebenen Konzentration OH-hTGF $\beta$  Sequenz 1380 bzw. OH-hTGF $\beta$  Sequenz 1247 transfiziert und die relative TGF $\beta_1$ -mRNA Expression mittels qRT-PCR bestimmt. Graue Balken entsprechen der unbehandelten Kontrolle bzw. der Transfektion mit der unspezifischen Kontroll-RNA (OHc). Gezeigt sind Mittelwerte aus Duplikaten von einem repräsentativen Versuch.

Als nächstes wurde die Effizienz der Genexpressionshemmung von 5'-ppp-modifizierter siRNA untersucht. Transfektion mit ppp-hTGF $\beta$  Sequenz 1380 (im

Weiteren als ppp-hTGF $\beta$  bezeichnet) führte zu einer ähnlich gut ausgeprägten Reduktion der TGF $\beta_1$  mRNA wie die unmodifizierte OH-TGF $\beta$  siRNA (**Abbildung 35**). Die Kontrollen OH-GFP (irrelevante RNA-Sequenz) und ppp-GFP hatten hingegen keinen signifikanten Einfluss.



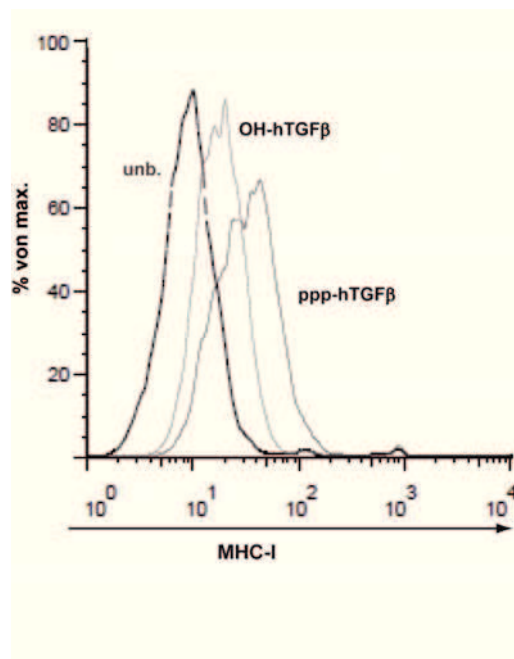
**Abbildung 36: Genexpressionshemmung von TGF $\beta_1$  durch unmodifizierte und 5'-ppp-modifizierte siRNA.**

PANC-1 Zellen wurden einmal mit 1  $\mu$ g/ml der angegebenen siRNA transfiziert und die relative Menge an TGF $\beta_1$  mRNA mittels qRT-PCR gemessen. Gezeigt sind Mittelwerte + S.D. aus Duplikaten eines repräsentativen Ergebnisses von zwei unabhängigen Versuchen.

### 3.3.2.2. Immunaktivierende Effekte von ppp-hTGF $\beta$ auf humane Pankreaskarzinomzelllinien

#### 3.3.2.2.1. Regulation der MHC Klasse I Expression

Wie bereits für die 5'-ppp-modifizierte siRNA gegen murines TGF $\beta_1$  beschrieben, wurde auch die humane ppp-siRNA auf ihre RIG-I aktivierende Komponente mit humanen Karzinomzelllinien untersucht. Im ersten Schritt wurden dazu PANC-1 Zellen mit OH- bzw. ppp-hTGF $\beta$  transfiziert und die MHC-I Expression durchflusszytometrisch bestimmt. Behandlung mit ppp-hTGF $\beta$  führte zu einer deutlichen Hochregulation von MHC-I-Molekülen auf der Zelloberfläche (**Abbildung 35**).

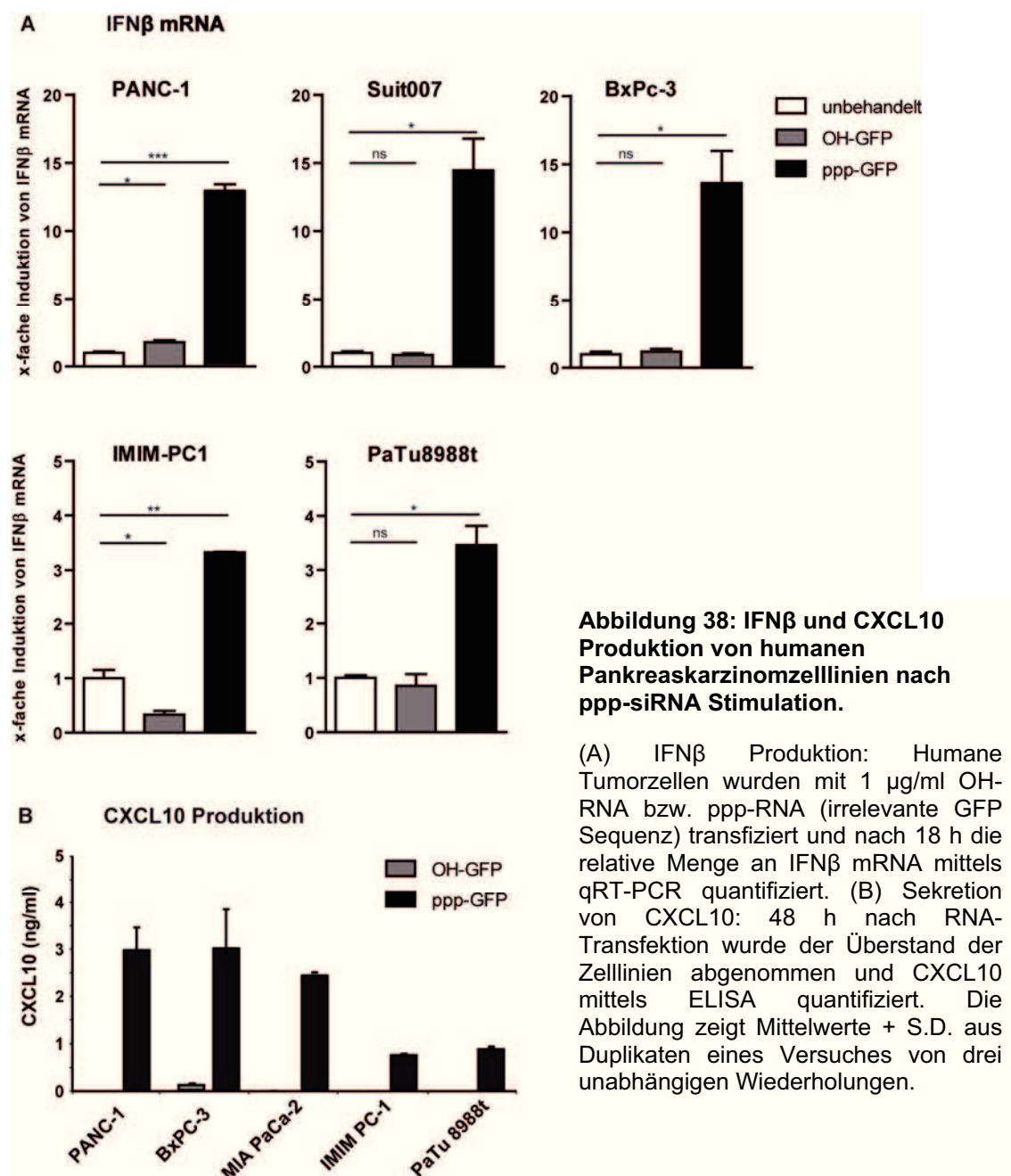


**Abbildung 37: Expression von MHC-I auf PANC-1 Zellen nach Behandlung mit ppp-hTGFβ.**

PANC-1 Zellen wurden mit 1 µg/ml ppp-hTGFβ (schwarze Linien) bzw. OH-hTGFβ (hellgraue Linien) transfiziert und nach 24 h die Expression von MHC-I (HLA-A,B,C) durchflusszytometrisch bestimmt (unbehandelte Kontrolle: gestrichelte Linien). Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Ergebnis von drei unabhängigen Experimenten.

### 3.3.2.2.2. Induktion proinflammatorischer Zytokine und Chemokine

In einer Reihe humaner Pankreaskarzinomlinien wurde das Ansprechen auf die Transfektion mit 5'ppp-modifizierter siRNA (hier wurde ppp-GFP verwendet) auf die Produktion von IFNβ und CXCL10 untersucht. In **Abbildung 38** lässt sich eine deutliche Steigerung der IFNβ mRNA sowie der CXCL10 Proteinproduktion nach Transfektion mit 5'ppp-modifizierter siRNA erkennen. Transfektion mit unmodifizierter OH-GFP hingegen ließ die IFNβ mRNA und CXCL10 Protein-Expression unbeeinflusst.

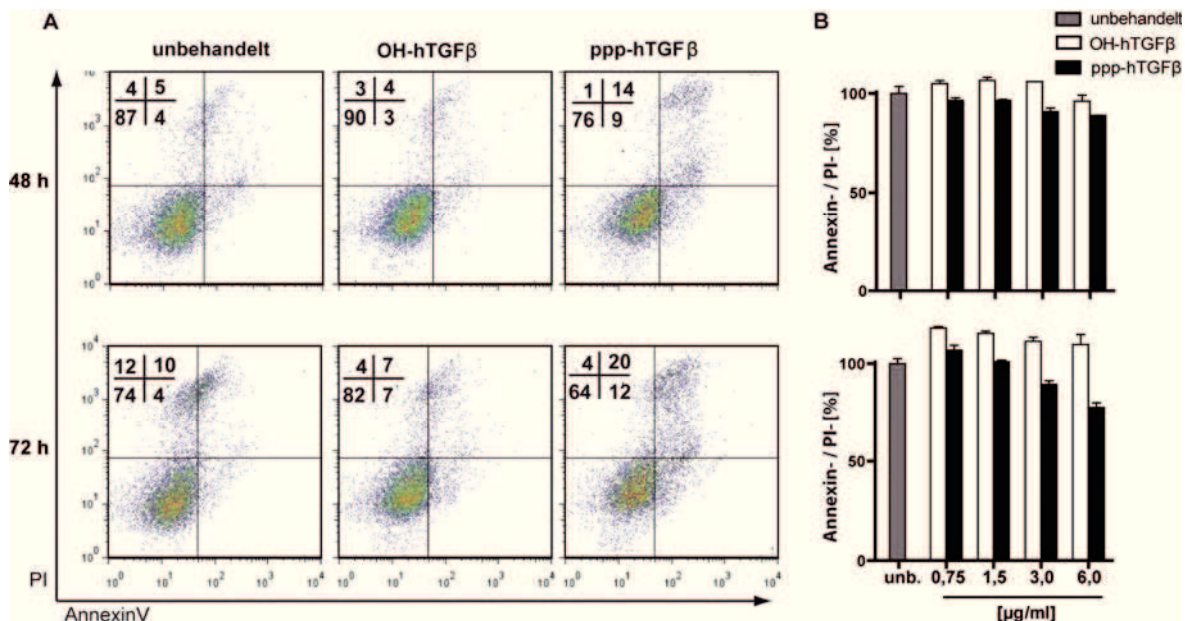


### 3.3.2.3. Zeit- und Dosisabhängigkeit der Apoptoseinduktion durch Therapie mit ppp-hTGF $\beta$

Des Weiteren wurde auch die Apoptoserate der humanen Pankreaskarzinomzellen nach Transfektion mit 5'ppp-modifizierter siRNA untersucht. Dazu wurden zunächst PANC-1 Zellen mit steigenden Konzentrationen (0,75 bis 6,0  $\mu$ g/ml) OH- bzw. ppp-hTGF $\beta$  transfiziert und nach 48 und 72 Stunden deren Vitalität mittels Annexin V- / Propidiumiodid-Färbung bestimmt. **Abbildung 39** zeigt repräsentative durchflusszytometrische Analysen bei einer RNA-Konzentration von 3  $\mu$ g/ml sowie die Dosisabhängigkeit, jeweils bezogen auf die unbehandelte Kontrolle. Bei der höchsten

## Ergebnisse

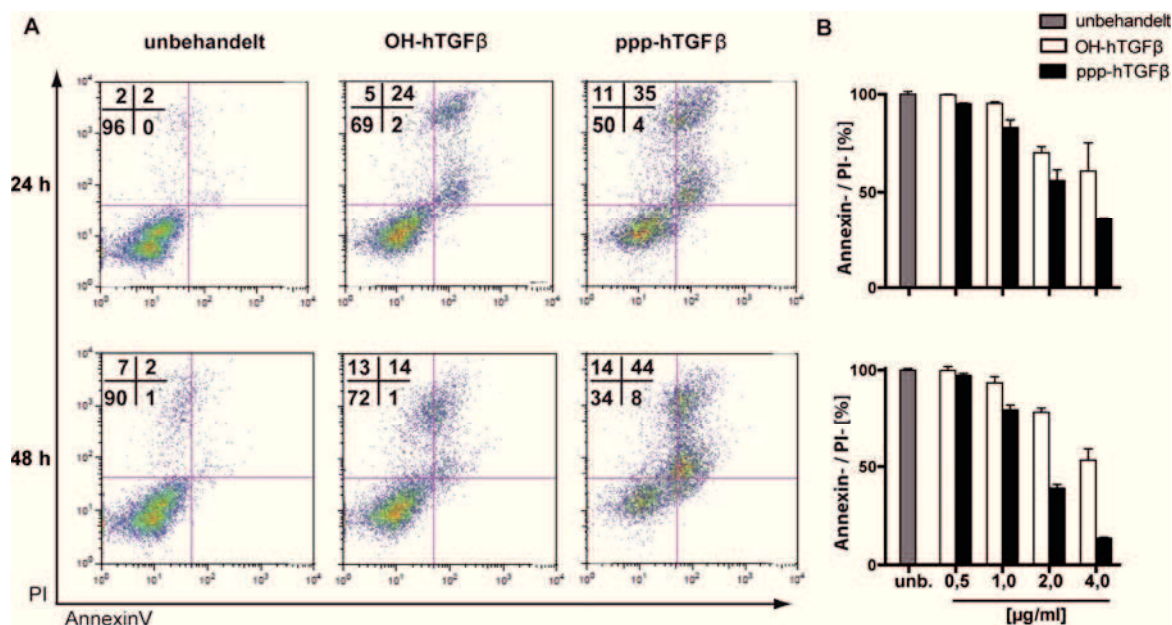
RNA-Konzentration konnte bei PANC-1 Zellen nach 72 Stunden nur ein mäßiger Effekt auf die Apoptose beobachtet werden. Diese Zelllinie verfügt somit über eine geringe Sensitivität gegenüber einer RIG-I-vermittelten Apoptoseinduktion.



**Abbildung 39: Apoptoseinduktion durch Transfektion mit ppp-hTGFβ in PANC-1 Zellen.**

Tumorzellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen ppp-hTGFβ (schwarze Balken) bzw. OH-hTGFβ (weiße Balken) transfiziert, nach 48 bzw. 72 h geerntet und anschließend mit Annexin V-APC/ PI für die durchflusszytometrische Analyse gefärbt. (A) Repräsentative Dotplots nach Transfektion mit 3 µg/ml der jeweiligen RNA. (B) Dosisabhängigkeit des proapoptotischen Effekts. Dargestellt ist der Anteil der vitalen Zellen (Annexin V-/PI-) bezogen auf die unbehandelte Kontrolle (grauer Balken). Gezeigt sind Mittelwerte + S.D. aus Duplikaten eines repräsentativen Ergebnisses bei drei unabhängigen Versuchen.

Als nächstes wurde die Apoptose in einer weiteren humanen Pankreaskarzinom Zelllinie, Suit007, untersucht. Im Gegensatz zu PANC1 zeigte Suit007 ein deutliches Ansprechen auf die Transfektion mit 5'ppp-siRNA (**Abbildung 40**). Bereits nach 24 Stunden zeigte sich bei 2 µg/ml ppp-RNA eine Reduktion der Zellviabilität auf 50%, nach 48 Stunden lag sie bei 34%. Auch die Transfektion von OH-hTGFβ zeigte ab einer Konzentration von 4 µg/ml einen Apoptose-induzierenden Effekt, welcher als unspezifische Toxizität der Transfektion zu werten ist, da ein ähnlicher Effekt auch für eine Kontroll-RNA ohne *gene silencing* zu beobachten war (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 40: Apoptoseinduktion durch Transfektion mit ppp-hTGFβ in Suit007 Zellen.**

Tumorzellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen ppp-hTGFβ (schwarze Balken) bzw. OH-hTGFβ (weiße Balken) transfiziert, nach 24 bzw. 48 h geerntet und anschließend mit AnnexinV-APC/ PI für die durchflusszytometrische Analyse gefärbt. (A) Repräsentative Dotplots nach Transfektion mit 2 µg/ml der jeweiligen RNA. (B) Dosisabhängigkeit des pro-apoptotischen Effekts. Dargestellt sind Mittelwerte + S.D. aus Duplikaten der lebenden Zellen (Annexin V-/ PI-) bezogen auf die unbehandelte Kontrolle (grauer Balken).

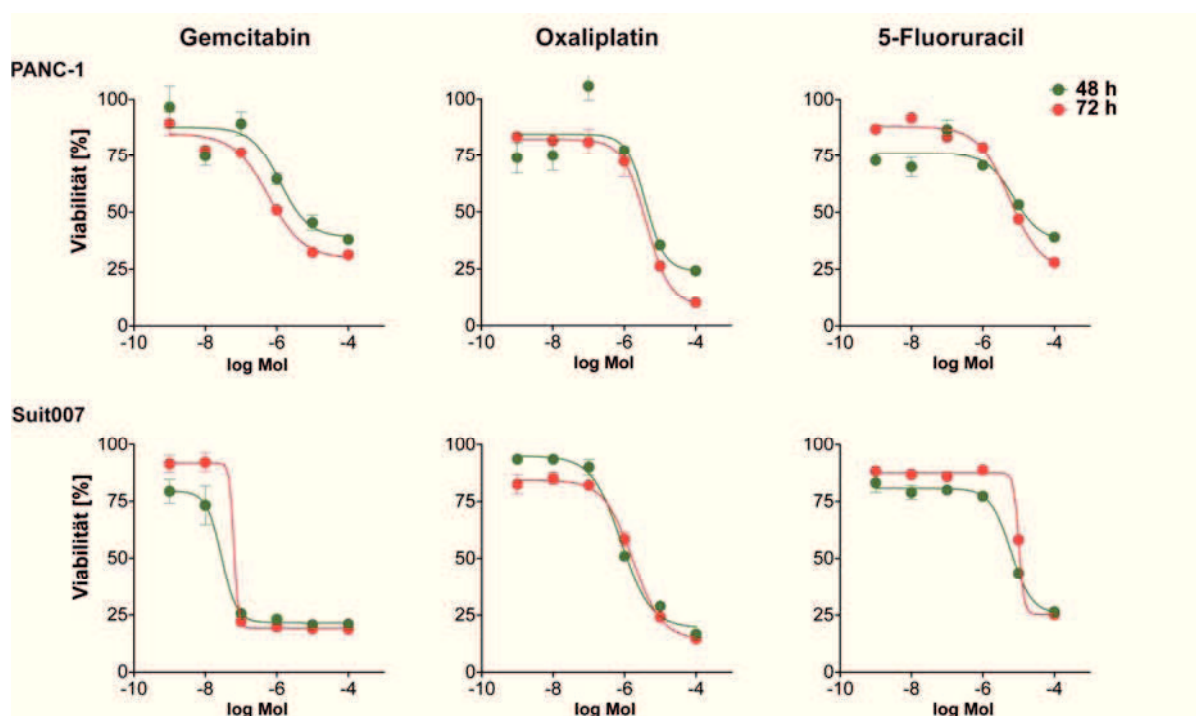
### 3.3.3. Sensitivität gegenüber Chemotherapeutika

Für die Dosisfindung wurde die Sensitivität der humanen Pankreaskarzinomzellen gegenüber den Chemotherapeutika Gemcitabin, Oxaliplatin und 5-Fluoruracil *in vitro* untersucht. Dazu wurden die verschiedenen Zelllinien mit steigenden Zytostatikakonzentrationen inkubiert und anschließend in einem Zeitraum von 24 bis 72 Stunden deren Viabilität gemessen. **Abbildung 41** zeigt die Ergebnisse zweier ausgewählter Zelllinien, die ein unterschiedliches Ansprechen auf die Standardchemotherapeutika zeigen. Titrationensreihen weiterer Zelllinien finden sich im Anhang (s. **Abbildung 53**). PANC-1 Zellen erwiesen sich mit einem logEC75 von -6,4 als relativ resistent gegenüber Gemcitabin, wohingegen die Linie Suit007 ein deutlich sensitiveres Ansprechen mit einem logEC75 von -7,8 zeigte. Beide Zelllinien waren relativ unempfindlich gegenüber Behandlung mit Oxaliplatin und 5-FU. Hier lagen die logEC75 Werte im Durchschnitt deutlich niedriger (**Tabelle 14**).



	Gemcitabin	Oxaliplatin	5-FU
PANC-1 logEC75 (48h)	-6,4	-5,1	-5,6
Suit007 logEC75 (48h)	-7,8	-6,5	-5,5

Tabelle 14: logEC75 Werte der drei Chemotherapeutika in PANC-1 sowie Suit007 Zellen.

**Abbildung 41: Sensitivität humaner Pankreaskarzinomzelllinien gegenüber Chemotherapie.**

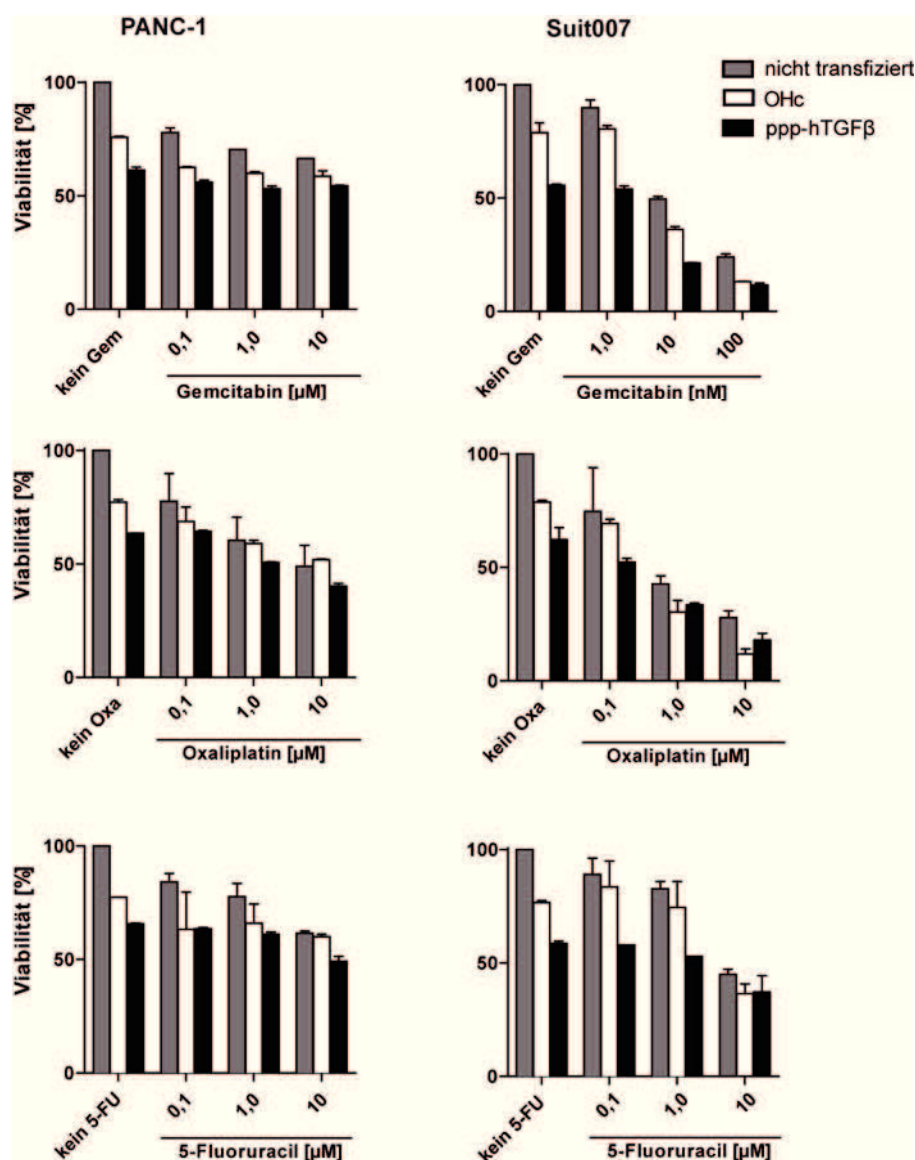
PANC-1 und Suit007 Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen Gemcitabin, Oxaliplatin und 5-Fluoruracil inkubiert und deren Viabilität nach 48 und 72 h mittels *CellTiter Blue* Assay bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte aus Triplikaten relativ zur unbehandelten Kontrolle. Die Abbildung zeigt ein von zwei unabhängigen Experimenten. Titrationsreihen der Chemotherapeutika für weitere humane Pankreaskarzinomlinien finden sich im Anhang (s. Abb. 53).

### 3.3.4. Apoptoseinduktion durch Chemoimmuntherapie in PANC-1 und Suit007 Zellen

Im folgenden Experiment wurde die Vitalität der zwei ausgewählten humanen Pankreaskarzinomzellen PANC-1 und Suit007 nach einer kombinierten Therapie aus 5'ppp-modifizierter siRNA gegen TGF $\beta_1$  und den verschiedenen Chemotherapeutika gemessen und eine mögliche gegenseitige Verstärkung der Apoptose untersucht. Aus den Erkenntnissen der vorherigen Versuche mit den einzelnen Therapieansätzen

## Ergebnisse

wurden hier PANC-1 Zellen mit höheren Konzentrationen von ppp-hTGF $\beta$  und Chemotherapeutika behandelt als die sensitivere Linie Suit007. In PANC-1 Zellen ließ sich keine signifikante Verstärkung der Apoptose durch eine kombinierte Therapie nachweisen, wohingegen Suit007 Zellen bei Transfektion mit 2  $\mu$ g/ml ppp-hTGF $\beta$  und gleichzeitiger Behandlung mit 10 nM Gemcitabin eine deutlich verstärkte Apoptoserate zeigten als in beiden Einzeltherapien (**Abbildung 42**). Analog zu den Versuchen mit der murinen Panc02 Linie ließ sich dieser Effekt weder in der Kombination mit Oxaliplatin noch mit 5-FU beobachten.



**Abbildung 42: Effekt der RNA-basierten Chemoimmuntherapie auf die Zellviabilität humaner Pankreaskarzinomzellen.**

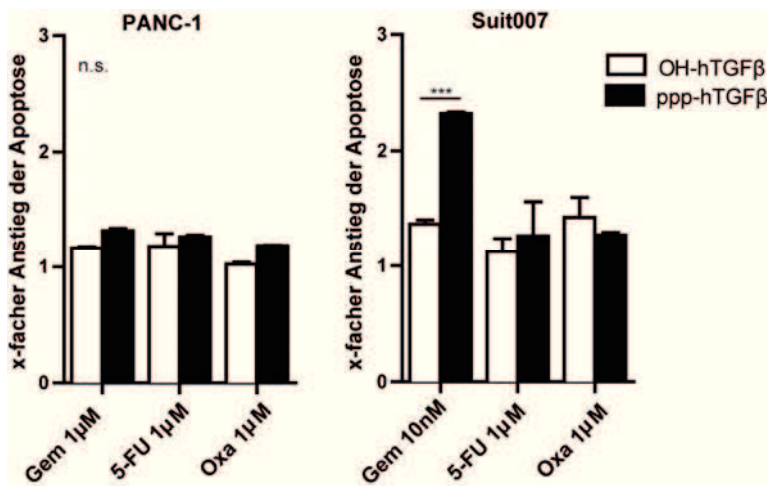
PANC-1 Zellen wurden mit jeweils 3  $\mu$ g/ml RNA transfiziert, Suit007 mit jeweils 2  $\mu$ g/ml RNA. Anschließend wurden die Zellen mit den Zytostatika in den angegebenen Konzentrationen inkubiert. Die Zellviabilität wurde nach 48 h mittels *Cell Titer Blue Assay* bestimmt. Die Graphen zeigen Mittelwerte aus Duplikaten + S.D. bezogen auf die unbehandelten, nicht transfizierten



## Ergebnisse

Kontrollzellen. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives von insgesamt vier unabhängigen Experimenten.

Die verbesserte Apoptoserate der Karzinomzelllinie Suit007 durch die gleichzeitige Behandlung mit Gemcitabin (10 nM) und 5'ppp-siRNA wird in **Abbildung 43** noch einmal verdeutlicht.



**Abbildung 43: Effekt der kombinierten Therapie mit ppp-hTGFβ und Zytostatika auf die Apoptoserate humaner Pankreaskarzinomzellen.**

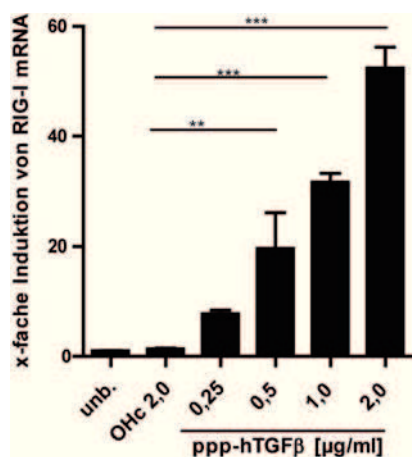
Der Graph zeigt den relativen Anstieg der Apoptoserate von PANC-1 und Suit007 Zellen nach kombinierter Chemoimmuntherapie im Vergleich zur alleinigen Zytostatikabehandlung mit Gemcitabin (Gem), 5-FU bzw. Oxaliplatin (Oxa) nach 48 h Inkubation (Daten aus obigem Versuch s. Abb. 42).

### 3.3.5. Mechanismus der verstärkten Apoptoserate durch Gemcitabinbehandlung in humanen Pankreaskarzinomzellen

Analog zu den Experimenten mit der murinen Panc02 Zelllinie wurde auch bei den humanen Pankreaskarzinomzellen der Einfluss einer Transfektion mit 5'ppp-RNA bzw. die Behandlung mit Zytostatika auf die Induktion des zytosolischen Rezeptors RIG-I sowie verschiedener pro- und anti-apoptotischer Proteine untersucht.

#### 3.3.5.1. Einfluss von ppp-hTGFβ und Chemotherapie auf die RIG-I Expression

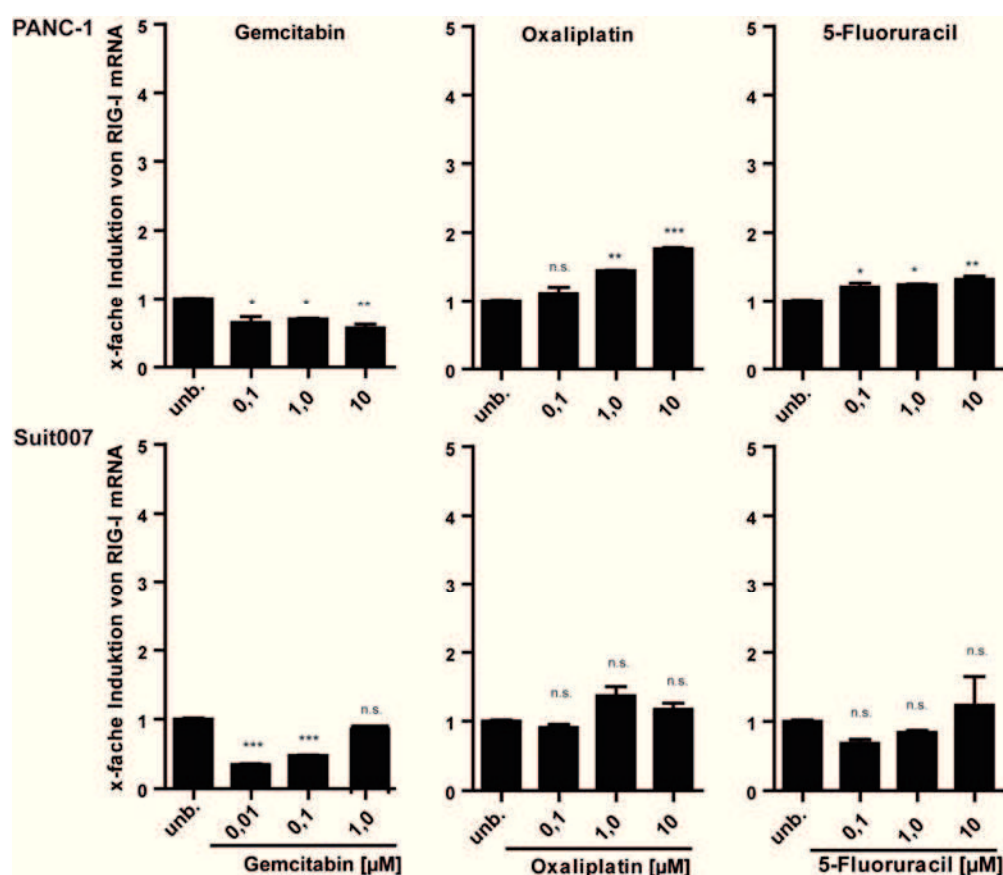
Auch in der humanen Zelllinie PANC-1 wurde eine dosisabhängige Hochregulation von RIG-I durch Transfektion mit ppp-RNA beobachtet (**Abbildung 44**).



**Abbildung 44: Einfluss von ppp-hTGFβ auf die RIG-I Expression in PANC-1 Zellen.**

Die Tumorzellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen von Kontroll RNA (OHc) bzw. ppp-hTGFβ behandelt und nach 18 h die relative Menge an RIG-I mRNA bezogen auf die unbehandelte Kontrolle mittels qRT-PCR bestimmt. Gezeigt sind Mittelwerte + S.D. von Duplikaten.

Eine Behandlung mit den Chemotherapeutika Gemcitabin, Oxaliplatin und 5-Fluoruracil zeigte weder in PANC-1 noch in Suit007 Zellen einen relevanten Einfluss auf die RIG-I Expression (**Abbildung 45**), wobei eine Hochregulation der mRNA Level erst ab einem Wert von mehr als 2-fach als relevant erachtet wurde.



**Abbildung 45: Einfluss von Zytostatika auf die RIG-I Expression in PANC-1 und Suit007 Zellen.**

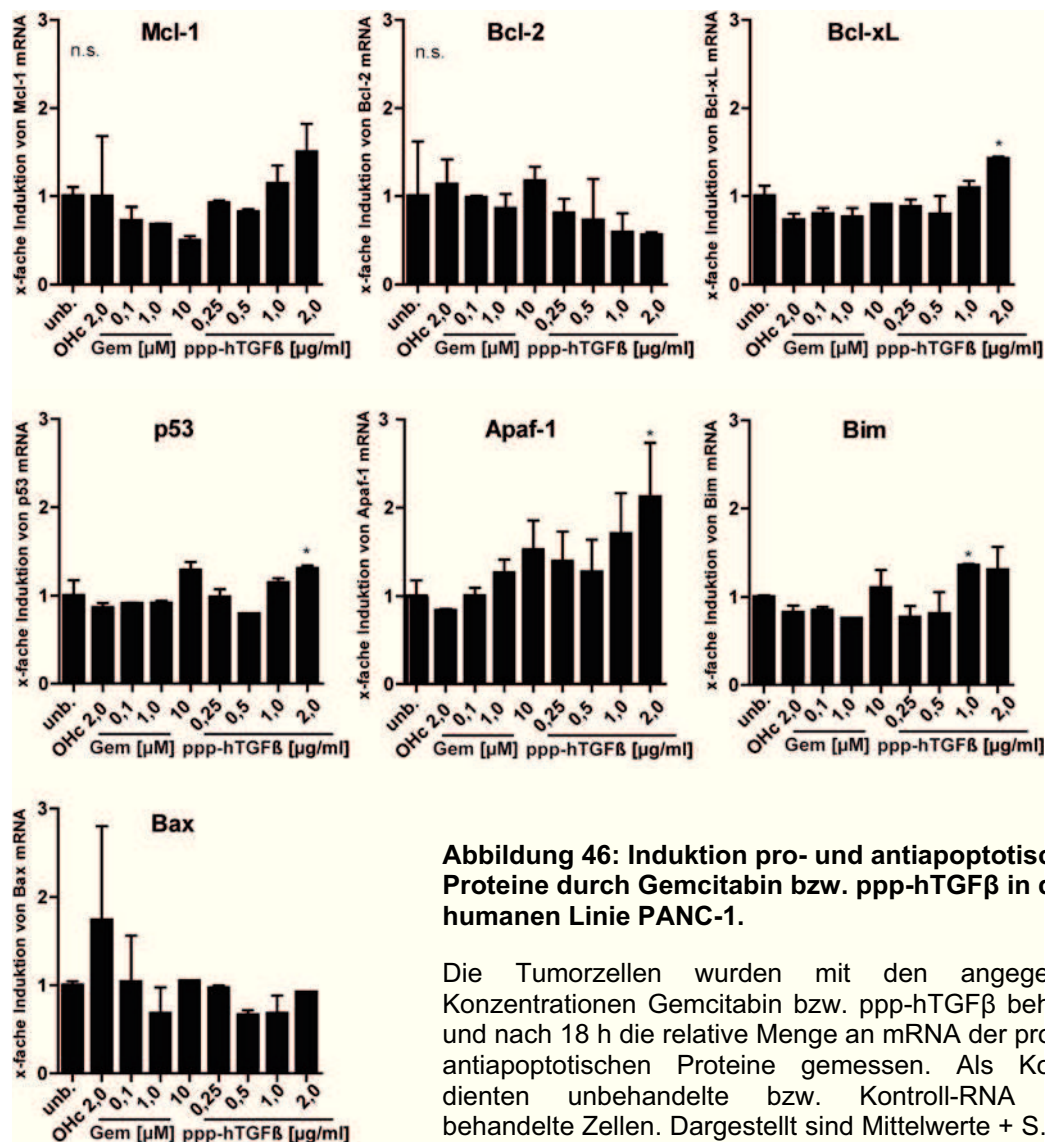
Die Tumorzellen wurden mit den Zytostatika Gemcitabin, Oxaliplatin und 5-FU in den angegebenen Konzentrationen behandelt und nach 18 h die relative Menge an RIG-I mRNA

## Ergebnisse

bezogen auf die unbehandelten Kontrollen mittels qRT-PCR bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte + S.D. aus Duplikaten.

### 3.3.5.2. Induktion pro-apoptotischer Moleküle durch Chemotherapie bzw. ppp-hTGF in humanen Tumorzelllinien

Im folgenden Experiment wurde analog zu den Versuchen mit murinen Panc02 Zellen die Induktion verschiedener pro- sowie anti-apoptotischer Proteine durch die Gabe von Chemotherapeutika bzw. Transfektion mit ppp-RNA in der humanen Zelllinie PANC-1 untersucht. Weder durch Gemcitabin noch durch ppp-hTGF zeigte sich ein signifikanter Einfluss auf die Expression von Mcl-1, Bcl-2, Bcl-xL, p53, Apaf-1, Bim oder Bax (Abbildung 46).

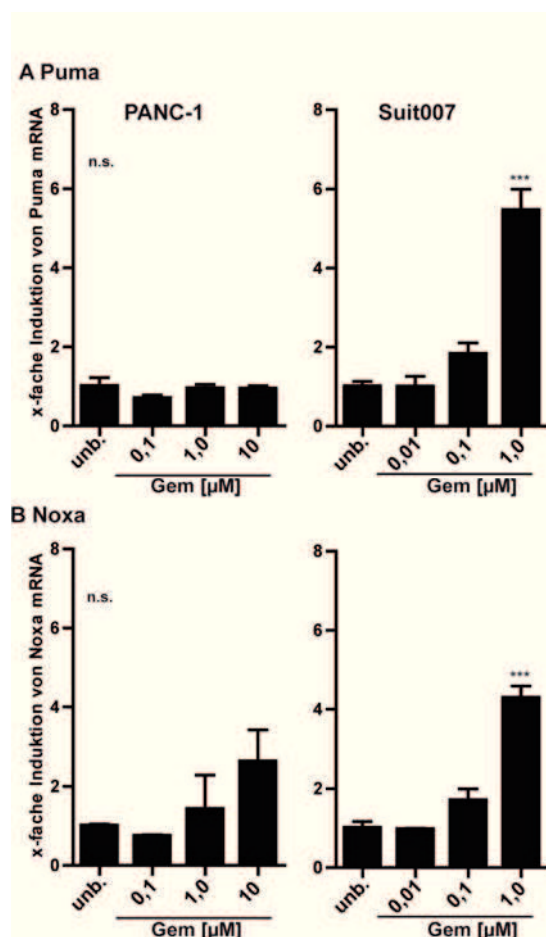


**Abbildung 46: Induktion pro- und antiapoptotischer Proteine durch Gemcitabin bzw. ppp-hTGFβ in der humanen Linie PANC-1.**

Die Tumorzellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen Gemcitabin bzw. ppp-hTGFβ behandelt und nach 18 h die relative Menge an mRNA der pro- bzw. antiapoptotischen Proteine gemessen. Als Kontrolle dienten unbehandelte bzw. Kontroll-RNA (OHc) behandelte Zellen. Dargestellt sind Mittelwerte + S.D. aus Duplikaten.

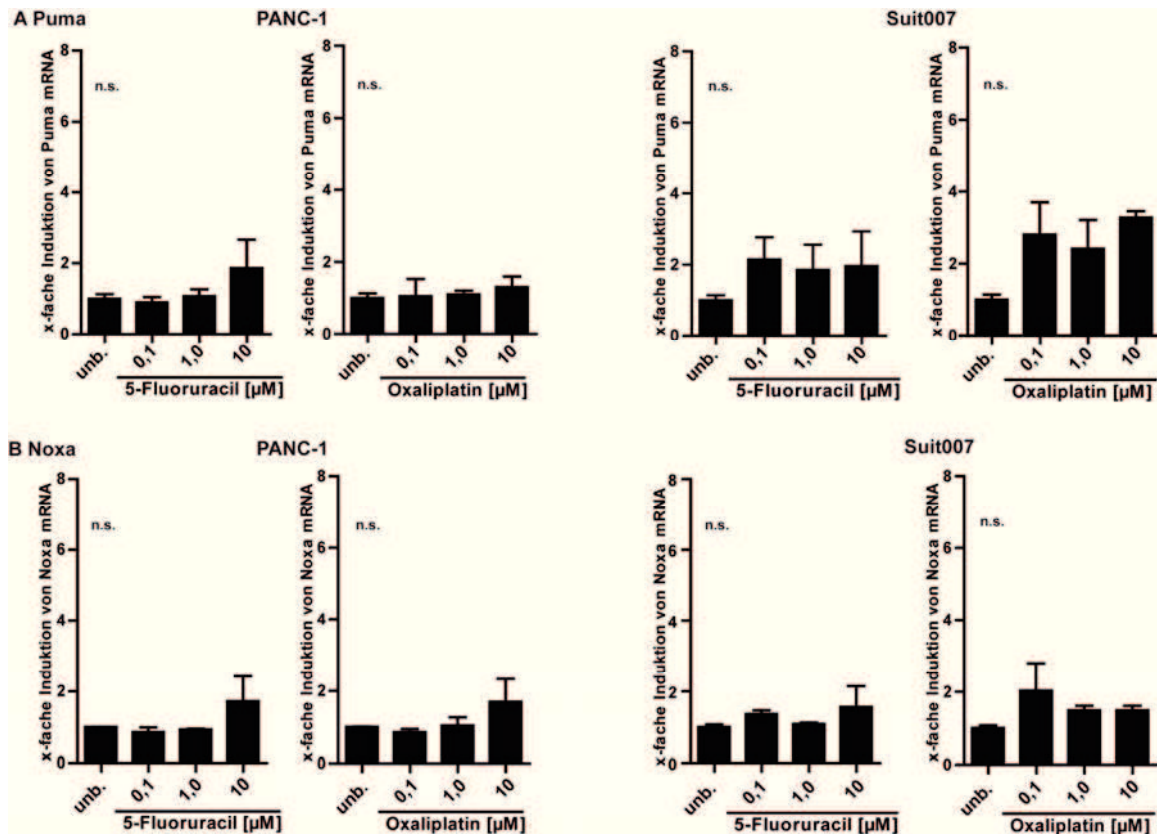
## Ergebnisse

In den folgenden Experimenten wurde das Augenmerk analog zu den Versuchen mit Panc02 Zellen auf die Induktion der pro-apoptotischen Proteine Puma und Noxa durch die Chemotherapeutika gelegt. Dabei lieferten die beiden Zelllinien PANC-1 und Suit007 unterschiedliche Ergebnisse (**Abbildung 47**). Während in PANC-1 Zellen keine Induktion von Puma durch Gemcitabin nachgewiesen werden konnte, stieg die relative Menge an Puma mRNA in Suit007 auf das 5,5-fache nach Behandlung mit 1  $\mu\text{M}$  Gemcitabin. Noxa zeigte eine tendenzielle Zunahme der mRNA in mit Gemcitabin behandelten PANC-1 Zellen und einen deutlichen Anstieg in Suit007 Zellen auf das 4,3-fache. Eine Behandlung mit den Zytostatika Oxaliplatin und 5-Fluoruracil zeigte weder in PANC-1 noch in Suit007 Zellen eine signifikante Hochregulation der Puma oder Noxa Expression auf mRNA-Ebene (**Abbildung 48**).



**Abbildung 47: Einfluss von Gemcitabin auf die Expression von Puma und Noxa in humanen Tumorzellen.**

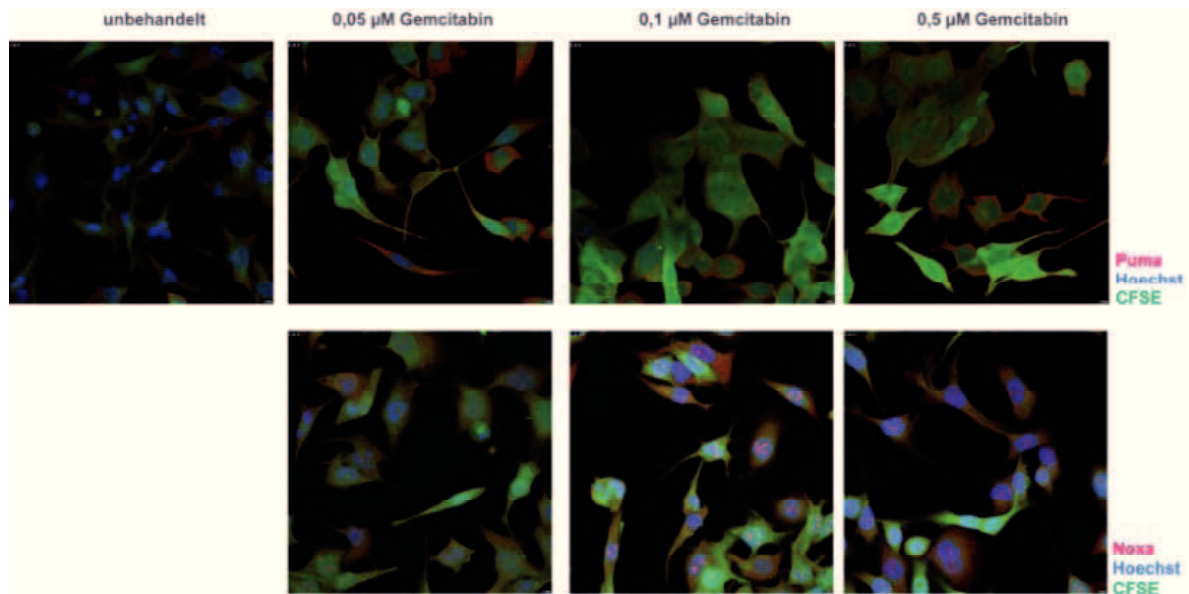
Die humanen Pankreaskarzinom-Zellen PANC-1 (links) und Suit007 (rechts) wurden mit den angegebenen Konzentrationen an Gemcitabin behandelt und nach 18 h die relative mRNA-Menge von (A) Puma und (B) Noxa mittels qRT-PCR bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte + S.D. aus Duplikaten.



**Abbildung 48: Einfluss von 5-FU und Oxaliplatin auf die Puma und Noxa Expression in humanen Tumorzellen.**

PANC-1 (links) und Suit007 (rechts) Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen von 5-FU bzw. Oxaliplatin behandelt und nach 18 h die mRNA Menge von (A) Puma und (B) Noxa mittels qRT-PCR bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte + S.D. aus Duplikaten.

Eine Zunahme der Puma und Noxa Expression in Suit007 Zellen durch Gemcitabin konnte auch auf Proteinebene mittels Immunfluoreszenzzytologie nachgewiesen werden. **Abbildung 49** zeigt repräsentative mikroskopische Aufnahmen von mit Gemcitabin behandelten Suit007 Zellen.



**Abbildung 49: Expression von Puma und Noxa auf Proteinebene in humanen Suit007 Zellen nach Gabe von Gemcitabin.**

Die Tumorzellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen Gemcitabin behandelt und die Expression von Puma und Noxa nach 48 h mittels Immunfluoreszenz untersucht. Gezeigt sind repräsentative Ausschnitte aus Triplikaten aus zwei unabhängigen Versuchsreihen.

## 4. Diskussion

### 4.1. RLH als molekulare Zielstrukturen einer Tumorimmuntherapie

5'-Triphosphat-modifizierte siRNA (ppp-siRNA) stellt einen innovativen Therapieansatz in der Behandlung des Pankreaskarzinoms dar, wobei die Wirksamkeit auf mehreren Mechanismen beruht: Zum einen auf der sequenzspezifischen Expressionshemmung eines tumorfördernden Gens mittels dem Prinzip der RNA-Interferenz; zum anderen auf der Aktivierung des *pattern recognition receptor* RIG-I, der im Zytosol vorhandene ppp-RNA erkennt und nach Aktivierung eine anti-virale Immunantwort auslöst (Hornung, Ellegast et al. 2006). In der experimentellen Therapie von Tumoren hat man sich dieses duale Wirkprinzip bereits zu Nutze gemacht, um eine adaptive Immunantwort gegen den Tumor auszulösen, sowie eine verstärkte Apoptoseinduktion in den Tumorzellen zu erzielen (Poeck, Besch et al. 2008; Ellermeier, Wei et al. 2013; Meng, Xia et al. 2013).

In einer vorausgegangenen Arbeit unserer Arbeitsgruppe konnte RIG-I als molekulare Zielstruktur für die Immuntherapie des Pankreaskarzinoms identifiziert werden. In Biopsien aus humanen Pankreaskarzinomen ließ sich in allen untersuchten Tumoren immunhistochemisch die Expression von RIG-I nachweisen (Kooperation mit Frau PD Dr. med. Doris Mayer, Pathologisches Institut der LMU München). Anhand diverser Zelllinien konnte zudem die Funktionalität des RIG-I Signalwegs demonstriert werden. Ferner führte im orthotopen syngenem Pankreaskarzinommodell in C57BL/6 Mäusen eine systemische Therapie mit einer gegen TGF $\beta$  gerichteten ppp-siRNA zur vermehrten Tumorzellapoptose sowie zu einer intratumoralen Th1-Antwort mit vermehrter Infiltration mit CD8<sup>+</sup> T-Zellen (Ellermeier, Wei et al. 2013). Für eine klinische Anwendung wäre es wünschenswert, wenn sich diese im Mausmodell effektive Immuntherapie mit Chemotherapeutika, die in der Therapie des Pankreaskarzinoms etabliert sind, zu einer Chemoimmuntherapie kombinieren ließe. Die präklinische Analyse einer solchen Kombinationstherapie war das Ziel der hier vorliegenden Arbeit.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Immuntherapie basierend auf bifunktioneller ppp-siRNA gegen TGF $\beta$ <sub>1</sub> mit den Chemotherapeutika Gemcitabin, 5-FU sowie Oxaliplatin kombiniert und Effekte auf die Induktion von Apoptose in den Tumorzellen untersucht. Zum Einsatz kam einerseits die murine Pankreaskarzinomlinie Panc02, für die in unserer Arbeitsgruppe ein sygenes orthotopes Tumormodell für *in vivo* Untersuchungen etabliert ist. Andererseits wurden verschiedene humane Pankreaskarzinomzelllinien bezüglich ihres Ansprechens auf eine kombinierte



Chemoimmuntherapie *in vitro* untersucht, um die potenzielle translationale Bedeutung der Untersuchungen zu evaluieren.

Als wichtige Grundlage für die Untersuchungen ließ sich sowohl in murinen als auch humanen Pankreaskarzinomzelllinien die funktionelle Expression von RIG-I bestätigen (s. **Abb. 6** und **Abb. 34**). Die Transfektion mit ppp-siRNA resultierte bei allen verwendenden Zelllinien in einer Hochregulation der RIG-I-Expression auf mRNA-Ebene. Die Liganden-induzierte Hochregulation von RIG-I wurde bereits für Melanomzelllinien beschrieben (Besch, Poeck et al. 2009) und in dieser Arbeit für Pankreaskarzinomzellen bestätigt. Dies ist insofern relevant, da in den meisten untersuchten Zelllinien die basale RIG-I-Expression relativ gering war, eine Liganden-induzierte Expressionsinduktion jedoch auf einen funktionellen Regelkreis in den Tumorzellen hinweist. Neben RIG-I stellt MDA5, ein weiteres Mitglied aus der Familie der RIG-I-like Helikasen, eine mögliche Zielstruktur für die Immuntherapie dar (Besch, Poeck et al. 2009). Wie sich zeigte führte eine Stimulation mit IFN $\alpha$  sowohl in murinen als auch humanen Pankreaskarzinomzellen zu einer vermehrten Expression von MDA5 (s. **Abb. 51** und **Abb. 52**). Somit stellen auch synthetische Liganden von MDA5 potenzielle Kandidaten für eine Immuntherapie des Pankreaskarzinoms dar.

#### 4.2. RIG-I Aktivierung durch ppp-TGF $\beta$

Für die Immuntherapie des Pankreaskarzinoms stellt die vom Tumor ausgehende Immunsuppression durch TGF $\beta$  ein relevantes Problem dar. Ein Ziel der Immuntherapie muss es daher sein, diese zu überwinden. RIG-I Aktivierung führt zu einer Typ I IFN getragenen Immunantwort, die sowohl das angeborene als auch das adaptive Immunsystem aktiviert (Yoneyama and Fujita 2009). Zudem nimmt Typ I IFN eine zentrale Stellung in der Immunüberwachung von Tumoren ein (Dunn, Bruce et al. 2005). Eine Schlüsselrolle in diesem Prozess spielen aktivierte DC, NK- und T-Zellen, die an der Eliminierung von Tumorzellen beteiligt sind. Im Rahmen viraler Infektionen wird Typ I IFN nicht nur von Immunzellen sezerniert, sondern auch von Zellen epithelialen Ursprungs. Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass Pankreaskarzinomzellen nach RIG-I Aktivierung ebenfalls Typ I IFN sezernieren (Ellermeier, Wei et al. 2013). Dies konnte in dieser Arbeit auf mRNA Ebene bestätigt werden. Sowohl bei murinen Panc02 Zellen, als auch humanen Pankreaskarzinomzellen induzierte ppp-TGF $\beta$  erhöhte IFN $\beta$  mRNA Expressionslevel (s. **Abb. 8** und **Abb. 38**). Eine Ausnahme stellte die Zelllinie MiaPaCa-2 dar, bei der keine Induktion von IFN $\beta$  beobachtet wurde. Dies ist jedoch in Übereinstimmung mit



Literaturdaten, die bei MiaPaCa-2 ein Gendefekt auf Chromosom 9 und Verlust des IFN $\beta$ -Gens beschreiben (Chen, Zhang et al. 1996).

Neben IFN $\beta$  wurde auch die Sekretion des Chemokins CXCL10 (IP-10) nach RIG-I Aktivierung von Tumorzellen beschrieben (Poeck, Besch et al. 2008; Besch, Poeck et al. 2009; Ellermeier, Wei et al. 2013). Bei CXCL10 handelt es sich um den Liganden des Chemokinrezeptors CXCR3, der die Migration von T-Zellen, NK-Zellen, Makrophagen und DC reguliert (Dufour, Dziejman et al. 2002). In der Tat korrelierten erhöhte CXCL10 Serumspiegel in Mäusen mit Pankreaskarzinom, die mit ppp-TGF $\beta$  behandelt wurden, mit einer vermehrten Infiltration der Tumore mit CD8<sup>+</sup> T-Zellen, die entscheidend zur Tumorkontrolle beitrugen (Ellermeier, Wei et al. 2013). Sowohl *in vitro* als auch *in vivo* im Panc02 Tumormodell ließ sich eine RIG-I-vermittelte CXCL10 Produktion der Pankreaskarzinomzellen nachweisen (s. **Abb. 8**, **Abb. 32** und **Abb. 38**). Interessanterweise produzierten auch MiaPaCa-2 Zellen CXCL10, was auf einen intakten RIG-I Signalweg – trotz IFN $\beta$ -Deletion – in den Tumorzellen rückschließen lässt. In diesem Zusammenhang spielt wahrscheinlich auch eine vermehrte, über RIG-I-induzierte Expression von MHC-I Molekülen auf der Oberfläche der Tumorzellen eine Rolle, da diese essentiell für die Erkennung und Eliminierung von Tumorzellen durch CD8<sup>+</sup> T-Zellen sind (s. **Abb. 8** und **Abb. 37**). Inwiefern diese Mechanismen eine Rolle in der Immunkontrolle *in vivo* spielen, muss in weiteren Untersuchungen geklärt werden.

#### 4.3. TGF $\beta_1$ Expressions-hemmende Funktion von ppp-TGF $\beta$

In der vom Pankreaskarzinom ausgehenden Immunsuppression spielen neben bestimmten Zellpopulationen, wie regulatorischen T-Zellen und myeloiden Suppressorzellen (MDSC), Zytokine wie TGF $\beta_1$  eine tragende Rolle (Moutsopoulos, Wen et al. 2008; Yang, Pang et al. 2010). Eine elegante Möglichkeit die Expression definierter Proteine zu hemmen ist die therapeutische Anwendung von RNA-Interferenz mittels siRNA (Reynolds, Leake et al. 2004). In Arbeiten unserer Arbeitsgruppe konnten im Panc02 Tumormodell nach systemischer Therapie mit siRNA gegen TGF $\beta$  bzw. mit ppp-TGF $\beta$  verminderte TGF $\beta_1$  Spiegel sowohl im Serum als auch im Tumorgewebe der Tiere nachgewiesen werden (Ellermeier, Wei et al. 2013). *In vitro* resultierte eine Transfektion mit OH-mTGF $\beta$  in Panc02 Zellen in einer deutlich reduzierten Expression von TGF $\beta_1$  mRNA, wohingegen ppp-mTGF $\beta$  in dieser Arbeit eine variable Effizienz zeigte (s. **Abb. 7**). Bei humanen Pankreaskarzinomzellen war hingegen die Expressionshemmung von TGF $\beta_1$  gleichermaßen erfolgreich. *In vitro* zeigte sich nach Transfektion mit OH-hTGF $\beta$  und ppp-hTGF $\beta$  eine ähnlich effektive

Reduzierung der TGF $\beta$ <sub>1</sub> Expressionslevel (s. **Abb. 36**). Diese Divergenz bezüglich der TGF $\beta$  Hemmung bei bifunktioneller siRNA im Vergleich zur konventionellen siRNA reflektiert am ehesten die unterschiedliche Effizienz der *in vitro* Transkription mittels T7-Polymerase bei den verschiedenen Ansätzen. Eine standardisierte synthetische Herstellung der ppp-siRNA ohne Notwendigkeit der *in vitro* Transkription wäre in Hinblick auf weiterführende Studien, insbesondere klinischen Studien, wünschenswert.

Über welchen Mechanismus eine Reduktion der TGF $\beta$  Expression zu einer anti-tumoralen Immunantwort führt, ist vorerst rein spekulativ, wobei Untersuchungen mit CD8-depletierenden Antikörpern die wichtige Rolle von CD8<sup>+</sup> T-Zellen in diesem Zusammenhang belegen (Ellermeier, Wei et al. 2013). Verschiedene Mechanismen wurden beschrieben, über die TGF $\beta$  immunsuppressive Effekte vermittelt. Im Panc02 Tumormodell konnte unsere Arbeitsgruppe Beobachtungen machen, die sowohl auf eine Unterdrückung der Suppressivität von regulatorischen T-Zellen als auch von MDSC hinweisen. So resultierte die Suppression der TGF $\beta$ -Sekretion mittels siRNA in einer verminderten Expression von CD103 auf regulatorischen T-Zellen (Anz, Mueller et al. 2011). Da CD103 von besonders suppressiven regulatorischen T-Zellen exprimiert wird, könnte eine Therapie mit ppp-TGF $\beta$  die von regulatorischen T-Zellen ausgehende Unterdrückung der anti-tumoralen CTL Antwort vermindern. Ferner führte eine Therapie mit ppp-TGF $\beta$  zu einer Reduktion der Anzahl sowie phänotypischen Veränderungen von CD11b<sup>+</sup> Gr-1<sup>+</sup> MDSC in der Milz von Mäusen mit Panc02 Tumoren (Ellermeier, Wei et al. 2013). MDSC finden sich in vermehrter Anzahl in Lymphorganen sowie im Pankreaskarzinomgewebe und unterdrücken effektiv CD8<sup>+</sup> T-Zell-Antworten (Bayne, Beatty et al. 2012). Eine verminderte Suppressivität von MDSC konnte auch in Mäusen beobachtet werden, die eine Therapie mit rekombinantem IFN $\alpha$  erhalten hatten (Zoglmeier, Bauer et al. 2011). Somit könnte die Expressionshemmung von TGF $\beta$  mit gleichzeitiger Induktion von Typ I IFN durch ppp-TGF $\beta$  additive Effekte auf die vom Pankreaskarzinom ausgehende Immunsuppression haben. In der Tat zeigten Mäuse, die mit ppp-TGF $\beta$  behandelt wurden ein signifikant besseres Tumoransprechen als Tiere, die mit OH-TGF $\beta$  bzw. ppp-RNA ohne TGF $\beta$ -Expressionshemmung alleine behandelt wurden (Ellermeier, Wei et al. 2013).

#### 4.4. Induktion von Apoptose durch ppp-TGF $\beta$

Die Resistenz von Tumorzellen gegenüber Apoptose stellt eine therapeutische Herausforderung dar. Pankreaskarzinomzellen zeigen häufig eine *loss of function* Mutation des Tumorsuppressors p53, was ihre Sensitivität gegenüber pro-

apoptotischen Signalen herabsetzt (Scarpa, Capelli et al. 1993). Neue Therapieansätze, die p53-unabhängig Apoptose induzieren, sind somit dringend erforderlich. In Melanomzellen konnte gezeigt werden, dass eine RIG-I Aktivierung zu einer p53-unabhängigen Apoptoseinduktion führt (Besch, Poeck et al. 2009). Ferner beobachteten wir eine effektive Apoptose in humanen Pankreaskarzinomzellen unabhängig von ihrem p53-Mutationsstatus (Ellermeier, Wei et al. 2013).

Die Sensitivität von Pankreaskarzinomzellen gegenüber einer Apoptoseinduktion durch Behandlung mit ppp-TGF $\beta$  wurde in dieser Arbeit in Hinblick auf eine potenzielle Kombination mit Chemotherapeutika evaluiert. Murine Panc02 Zellen sowie humane Suit007 Zellen zeigten eine hohe Sensitivität mit einem deutlichen Anstieg der Apoptoserate nach Transfektion mit ppp-TGF $\beta$  im Vergleich zur Transfektion mit OH-TGF $\beta$  (s. **Abb. 9** und **Abb. 40**). Humane PANC-1 Zellen hingegen zeichnen sich durch eine weitgehende Resistenz gegenüber RIG-I-induzierter Apoptose aus (s. **Abb. 39**). Bei RIG-I-vermittelter Apoptose kommt es zur Induktion verschiedenster pro- sowie anti-apoptotischer Proteine (Besch, Poeck et al. 2009). Insbesondere Puma und Noxa, zwei Mitglieder der *BH3-only* proapoptotischen Bcl-2 Familie, scheinen in diesem Apoptoseweg eine Schlüsselrolle zu spielen. Zellspezifische Unterschiede hinsichtlich der Expressionslevel dieser Proteine könnten die variierende Sensitivität der Karzinomzellen erklären. Auf ausgewählte pro-apoptotische Proteine wird im Absatz **4.7.** näher eingegangen.

Besch et al. berichteten, dass dem anti-apoptotischen Protein Bcl-x<sub>L</sub> in Melanomlinien eine besondere Bedeutung zukommt, indem es nicht-maligne Zellen vor RIG-vermittelter Apoptoseinduktion schützen kann (Besch, Poeck et al. 2009). Auch im Panc02 Tumormodell blieb die Apoptoseinduktion nach systemischer Gabe von ppp-TGF $\beta$  auf den Tumor beschränkt, wohingegen normales Pankreasgewebe, Leber, Lunge und Milz der Tiere keine histopathologischen Auffälligkeiten zeigten (Ellermeier, Wei et al. 2013). Das spezifische Expressionsmuster pro- und anti-apoptotischer Proteine in normalen Pankreaszellen sowie in den einzelnen Pankreaskarzinomzelllinien bleibt im Detail zu evaluieren. Jedenfalls scheint der Apoptose-induzierende Effekt der RIG-I Aktivierung weitgehend auf maligne Zellen beschränkt zu sein, was zu einem günstigen Sicherheitsprofil dieser Therapiestrategie beitragen dürfte (Meng, Xia et al. 2013). Eine spezifische, tumorgerichtete Verabreichung ist jedoch für eine zukünftige klinische Entwicklung ein wichtiges Ziel.

Um additive bzw. synergistische Effekte einer kombinierten Chemoimmuntherapie herausarbeiten zu können, wurde in den Experimenten zur Kombinationstherapie eine für die Apoptose suboptimale Konzentration von ppp-TGF $\beta$  gewählt. Dies diente auch

der Reduktion unspezifischer Toxizität durch den Vorgang der RNA-Transfektion, da hohe Dosen von OH-TGF $\beta$  bzw. einer Kontroll OH-RNA zur Schädigung der Zellvitalität führten (s. **Abb. 9**, **Abb. 39** und **Abb. 40**).

#### 4.5. *In vitro* Sensitivität diverser Pankreaskarzinomlinien auf Zytostatika

Zytostatika üben ihre anti-proliferativen Effekte nicht nur spezifisch auf Karzinomzellen aus, sondern auch auf nicht-maligne Zellpopulationen mit hoher Proliferationsrate. Die daraus resultierende Toxizität auf Gewebe, wie Darmschleimhaut und Knochenmark, limitiert die Dosierung der Zytostatika. In den letzten Jahren wurde zudem erkannt, dass diverse Chemotherapeutika auch immunologische Effekte ausüben. Einerseits wurde die Eliminierung bestimmter immunsuppressiver Zellpopulationen, wie regulatorischer T-Zellen und MDSC, durch bestimmte Zytostatika beschrieben (Zitvogel, Apetoh et al. 2008). Andererseits können diese auch einen sogenannten immunogenen Zelltod von Tumorzellen auslösen, der zu einer adaptiven, gegen den Tumor gerichteten Immunantwort führt (Green, Ferguson et al. 2009). Für einige Chemotherapeutika wurde zudem eine verbesserte Sensitivität der Tumorzellen gegenüber CTL-vermittelter Lyse beobachtet (Uslu, Borsellino et al. 1997; Ramakrishnan, Assudani et al. 2010). Aus diesen Erkenntnissen lässt sich schließen, dass sich Chemotherapie und Immuntherapie nicht grundsätzlich ausschließen, sondern vielmehr synergistische Effekte möglich sind und eine sogenannte Chemoimmuntherapie eine interessante Therapiestrategie darstellt (Gabrilovich 2007; Ramakrishnan and Gabrilovich 2013).

In der hier vorliegenden Arbeit wurden die in der Therapie des Pankreaskarzinoms etablierten Chemotherapeutika Gemcitabin, 5-FU und Oxaliplatin verwendet. In einem ersten Schritt wurde bei murinen und humanen Karzinomzelllinien die Sensitivität gegenüber den drei Chemotherapeutika getestet (s. **Abb. 10**, **Abb. 41** und **Abb. 53**). Gemcitabin wird als *first line* Chemotherapie des Pankreaskarzinoms sowohl adjuvant als auch palliativ verwendet (Adler, Seufferlein et al. 2007). Auch in unseren *in vitro* Untersuchungen zeigte Gemcitabin eine gute antiproliferative Wirksamkeit, jedoch gab es deutliche Unterschiede bei den einzelnen Zelllinien. Insbesondere PANC-1 zeigte eine relative Resistenz gegenüber Gemcitabin. Die Wirksamkeit einer Therapie mit 5-FU war in den meisten Fällen deutlich unterlegen. Auch in der klinischen Praxis wird möglicherweise aus diesem Grund, zumindest in Europa und der USA, 5-FU wesentlich seltener eingesetzt. Bei gutem Allgemeinzustand der Patienten können auch Polychemotherapien mit Oxaliplatin als Kombinationspartner durchgeführt

werden, wie beispielsweise beim FOLFIRINOX Schema (Saif 2013). Hierbei erhöht sich allerdings nicht nur die Wirksamkeit der Therapie, sondern auch die Toxizität, was den Einsatz dieser Therapie limitiert.

Diese Limitierung besteht möglicherweise in geringem Ausmaß, wenn zwei unterschiedliche Wirkprinzipien wie zum Beispiel Chemotherapie und Immuntherapie miteinander kombiniert werden. Die optimalen Konzentrationen von Zytostatika bezüglich ihrer immunologischen Effekte sind bislang kaum untersucht worden. Allerdings scheinen geringe Zytostatika-Konzentrationen für bestimmte Effekte, wie Eliminierung von regulatorischen T-Zellen, eher günstig zu sein (North 1982; Le and Jaffee 2012). Auch für eine Sensitivierung der Tumorzellen gegenüber CTL-vermittelter Lyse reichen bereits subletale Konzentration aus (Uslu, Borsellino et al. 1997). Für die geplante Kombinationstherapie in diesem Projekt bestehend aus jeweils einem der drei genannten Zytostatika und der bifunktionellen ppp-siRNA gegen TGF $\beta_1$  wurden suboptimale Konzentrationen für jede Zelllinie evaluiert, um additive Effekte einer Chemoimmuntherapie auf die Apoptoserate herausarbeiten zu können.

#### 4.6. Effekte der Chemoimmuntherapie auf Tumorzell-Apoptose

Nachdem sowohl für die Therapie mit ppp-TGF $\beta$  als auch für die Chemotherapeutika jeweils suboptimale Konzentrationen bezüglich der Apoptoseinduktion identifiziert wurden, konnte die Effektivität einer kombinierten Chemoimmuntherapie untersucht werden. Bei gleichzeitiger Gabe von ppp-modifizierter siRNA und Gemcitabin konnte eine signifikante Zunahme der Apoptoserate in Panc02 Zellen beobachtet werden (s. **Abb. 12**). Interessanterweise bestand dieser additive Effekt nicht bei einer Kombination mit Oxaliplatin oder 5-FU. In Kinetikexperimenten konnte gezeigt werden, dass die Kombination von Gemcitabin mit ppp-TGF $\beta$  vor allem zu einer Beschleunigung der Apoptose führte, wobei der größte additive Effekt nach 30 Stunden gemessen wurde (s. **Abb. 14 B**). Dies legt nahe, die Chemoimmuntherapie sequenziell anzuwenden, also zunächst eine Behandlung mit Gemcitabin gefolgt von der Transfektion mit ppp-TGF $\beta$ , was in Folgearbeiten untersucht werden sollte.

Abschließend bleibt jedoch festzustellen, dass die Kombinationstherapie nicht bei allen humanen Tumorzelllinien gleich effektiv war. Die Apoptoserate von PANC-1 Zellen, die sich durch eine Resistenz gegenüber Gemcitabin auszeichnen, ließ sich auch durch die Kombinationstherapie nicht wesentlich steigern. Hingegen war der additive Effekt auf die Apoptoserate von Suit007 Zellen ausgeprägt (s. **Abb. 42** und **Abb. 43**). Wiederum war dieser Effekt analog zur murinen Panc02 Linie nur in Kombination mit

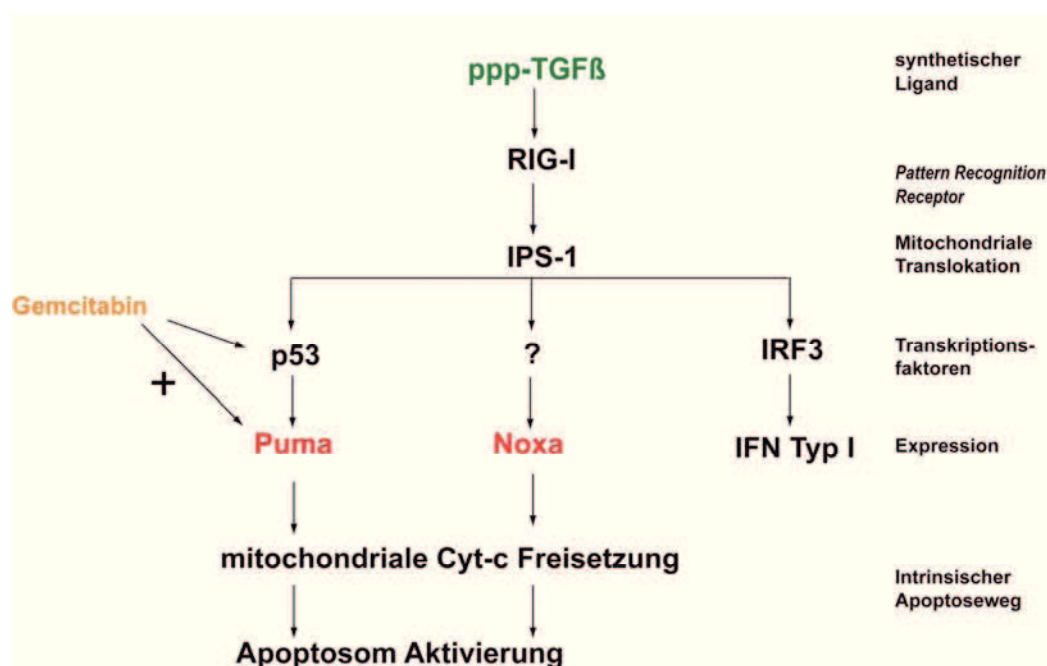
Gemcitabin, nicht jedoch mit Oxaliplatin oder 5-FU, zu beobachten. Um diese Diskrepanz besser verstehen zu können, wurden die Signalwege, die in der RIG-I-vermittelten Apoptose eine Rolle spielen, detaillierter untersucht.

#### 4.7. Rolle pro-apoptotischer Moleküle im intrinsischen Apoptoseweg

Aktivierung von RIG-I durch eine virale Infektion bzw. ppp-RNA führt zum programmierten Zelltod durch Aktivierung des intrinsischen, mitochondrialen Apoptosewegs (Besch, Poeck et al. 2009). Wichtige Mediatoren dieser Apoptosekaskade sind die so genannten *BH3-only* Proteine aus der Bcl-2 Familie (Giam, Huang et al. 2008). Besch et al. konnten zeigen, dass nach Aktivierung von RIG-I die beiden pro-apoptotischen Moleküle Noxa und Puma, beide *BH3-only* Proteine, hochreguliert werden und eine Schlüsselrolle in der Apoptose von Melanomzellen spielen (Besch, Poeck et al. 2009).

Als Erklärung für den additiven Effekt für die Chemoimmuntherapie in dieser Arbeit stellten wir die Hypothese auf, dass eine Gemcitabin-basierte Chemotherapie die Expression von *BH3-only* Proteinen oder alternativ die Expression von RIG-I in Pankreaskarzinomzellen beeinflusst. Wie erwartet steigerte eine Behandlung mit ppp-TGF $\beta$  die RIG-I-Expression dosisabhängig (s. **Abb. 16** und **Abb. 44**) (Ellermeier, Wei et al. 2013); hingegen hatten die Zytostatika keinen Einfluss auf die RIG-I-Expression (s. **Abb. 16** und **Abb. 45**). Die Behandlung mit ppp-TGF $\beta$  führte wie erwartet zu einer Hochregulation der pro-apoptotischen Proteine Puma und Noxa in Pankreaskarzinomzellen (s. **Abb. 18**). Interessanterweise ließ sich dieser Effekt auch für Gemcitabin sowohl in Panc02 als auch Suit007 Zellen beobachten (s. **Abb. 19** und **Abb. 47**). Eine Behandlung mit Oxaliplatin oder 5-FU hingegen hatte keinen Einfluss auf die Puma- und Noxa-Expression (s. **Abb. 19** und **Abb. 48**). Dieser bislang unbekannte und offensichtlich auch selektive Effekt von Gemcitabin könnte als Erklärung für die Verstärkung der RIG-I-vermittelten Tumorzellapoptose dienen. Interessanterweise fehlte dieser Effekt auf die Puma- und Noxa-Expression bei PANC-1 Zellen (s. **Abb. 47**). Dies korrelierte mit deren geringeren Sensitivität sowohl auf RIG-I-basierte als auch Chemoimmuntherapie-basierte Apoptose. Der exakte Einfluss von Puma bzw. Noxa auf die Apoptoseinduktion durch selektive Genexpressions-Hemmung mittels siRNA konnte nicht untersucht werden, da wiederholte siRNA-Transfektionen der Tumorzellen mit einer starken Toxizität einhergingen (Daten nicht gezeigt).

Gemcitabin bewirkt in behandelten Zellen durch den Einbau in die DNA eine DNA-Schädigung, woraus p53-vermittelt ein Zellzyklusarrest in der G2-Phase mit anschließender Apoptose resultiert. Allerdings sind auch Tumorzellen mit p53-Mutation (PANC-1, BxPc-3, MIA-Paca-2) in gewissem Umfang sensibel auf Gemcitabin-Behandlung, was auf alternative Wirkmechanismen schließen lässt. Aus den Ergebnissen dieser Arbeit lässt sich ableiten, dass Gemcitabin über eine Induktion von Puma und Noxa mit dem intrinsischen Apoptoseweg interagiert. Welche Rolle dieser Mechanismus bei der Zytotoxizität einer Therapie mit Gemcitabin spielt, ist Folgeuntersuchungen vorbehalten. Bezüglich der Kombination mit einer ppp-RNA-basierten Therapie ist diese Beobachtung jedoch sehr interessant, da Puma und Noxa wichtige Schlüsselmoleküle für die Apoptose nach RIG-I-Aktivierung darstellen. Besch et al. konnten nachweisen, dass die Apoptose über Puma p53-abhängig ist, wohingegen Noxa auch p53-unabhängig die Apoptose einleiten kann (Besch, Poeck et al. 2009). **Abbildung 50** stellt den potenziellen Zusammenhang von Gemcitabin und RIG-I-vermittelter Apoptose graphisch dar.



**Abbildung 50: Potenzielle Interaktion von Gemcitabin mit dem RIG-I-vermittelten Apoptoseweg.**

ppp-TGFβ aktiviert RIG-I, welches daraufhin mit dem Adaptermolekül IPS-1 auf der äußeren Mitochondrienmembran interagiert. Dadurch kommt es zur Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren. Die Apoptosekaskade verläuft dabei unabhängig von der Interferonproduktion. Gemcitabin induziert die Expression des pro-apoptotischen Moleküls Puma und potenziert somit die Einleitung der Apoptose (modifiziert nach (Zitvogel and Kroemer 2009)).

Unterschiedliche Expressionsmuster von pro- sowie anti-apoptotischen Molekülen könnte die unterschiedliche Sensitivität der Karzinomzellen gegenüber Chemotherapeutika aber auch RIG-I-vermittelter Apoptose erklären. Auch ließe sich dadurch evtl. begründen, weshalb PANC1 Zellen nach RIG-I Aktivierung zwar IFN $\beta$  und CXCL10 produzieren, jedoch bezüglich der Apoptose relativ resistent sind.

#### **4.8. Gemcitabin- und ppp-TGF $\beta$ -basierte Chemoimmuntherapie im Panc02 Tumormodell *in vivo***

Unsere Arbeitsgruppe konnte bereits die Wirksamkeit einer Immuntherapie basierend auf ppp-TGF $\beta$  im Panc02 Tumormodell *in vivo* demonstrieren (Ellermeier, Wei et al. 2013). Darauf aufbauend wurde in dieser Arbeit die Wirksamkeit einer Chemoimmuntherapie basierend auf ppp-TGF $\beta$  und Gemcitabin evaluiert. Die Festlegung auf Gemcitabin erfolgte, da nur für Gemcitabin ein additiver Effekt auf die Tumorzellapoptose *in vitro* beobachtet wurde. Im subkutanen Panc02-Tumormodell zeigte sich, dass die Kombinationstherapie das Tumorstadium deutlich verzögert und effektiver ist als die jeweiligen Einzeltherapien (s. **Abb. 21** und **Abb. 22**). Eine vermehrte Toxizität der Kombinationstherapie ließ sich in diesem Modell nicht beobachten, was uns ermutigte, Folgeuntersuchungen im orthotopen Panc02-Tumormodell durchzuführen, welches im Vergleich zum subkutanen Modell besser die klinische Situation abbildet und somit therapeutisch anspruchsvoller ist.

Während der Therapie wurden Anzahl und Aktivierungsstatus einzelner Leukozytenpopulationen im peripheren Blut analysiert (siehe **3.2.3.1.**). Dabei fiel auf, dass die Anzahl der an der anti-tumoralen Immunantwort beteiligten Effektorzellen (NK-Zellen, zytotoxische T-Zellen und T-Helferzellen) im peripheren Blut nach ppp-TGF $\beta$  bzw. Chemoimmuntherapie in der Frühphase deutlich verringert war. Hierbei scheint es sich jedoch nur um einen transienten Effekt zu handeln, da bereits nach 48 Stunden wieder ähnliche Leukozytenzahlen wie vor der Therapie gemessen werden konnten (Ellermeier, Wei et al. 2013). Möglicherweise ist die Abnahme der Leukozytenzahl im peripheren Blut mit deren verstärktem Aktivierungsstatus und damit verbundener endothelialen Adhäsion zu erklären. Denn NK-Zellen, CD8 $^{+}$  und CD4 $^{+}$  T-Zellen wiesen eine vermehrte Expression des Aktivierungsmarkers CD69 nach ppp-TGF $\beta$  Behandlung auf, was mit hohen Serumkonzentrationen pro-inflammatorischer Zytokine sowie des Chemokins CXCL10 korrelierte (s. **Abb. 32**).

Die Behandlung mit Gemcitabin alleine zeigte bei der in dieser Arbeit verwendeten Dosierung keine negativen Effekte auf die untersuchten Immunzellpopulationen.



Interessanterweise blieb auch die durch ppp-TGF $\beta$  induzierte Immunaktivierung und CXCL10 Produktion durch die zusätzliche Gabe von Gemcitabin erhalten. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass Gemcitabin als Partner in dieser Chemoimmuntherapie keine nachteiligen Effekte auf die Aktivierung des Immunsystems durch die systemische Gabe von ppp-TGF $\beta$  ausübt. Dies entspricht auch der klinischen Erfahrung. In einer Studie konnte gezeigt werden, dass die Funktionalität der Immunzellen von Patienten mit Pankreaskarzinom bei Therapie mit Gemcitabin erhalten bleibt, wobei Gemcitabin sogar eine Aktivierung von naiven T-Zellen förderte (Plate, Plate et al. 2005). In Zusammenschau mit den eingangs beschriebenen immunologischen Eigenschaften von Chemotherapeutika (s. **1.3.4.**) ergibt sich mit Gemcitabin ein vielversprechender Partner für Immuntherapien, der aktuell in einer klinischen Phase III Studie bereits in Kombination mit einer Telomerasen Peptid-Vakzine bzw. in Kombination mit Algenpantucel-L erprobt wird (Devito and Saif 2013).

Der Nachweis der TGF $\beta$  Expressionshemmung *in vivo* konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht bestätigt werden. In den Serumproben, die jeweils nach der zweiten und vierten ppp-TGF $\beta$ -Injektion entnommen wurden, konnte keine Reduktion der TGF $\beta$  Serumspiegel in den Tieren nachgewiesen werden (s. **Abb. 33**). In vorherigen Studien der Arbeitsgruppe konnte jedoch eine signifikante Verringerung des TGF $\beta$  Spiegels nach Gabe von ppp-TGF $\beta$  gezeigt werden (Ellermeier, Wei et al. 2013). Möglicherweise ist dies auf die variable Qualität der *in vitro* generierten ppp-siRNA zurückzuführen, worauf auch die schwache Hemmung von TGF $\beta$  mRNA *in vitro* hinweist. Eine alternative Synthesemöglichkeit mit geringeren Abweichungen bezüglich der siRNA-vermittelten Genexpressionshemmung wäre wünschenswert, um dieser Problematik entgegen zu wirken.

Im subkutanen Tumormodell zeigte sich bezüglich der Tumorkontrolle ein deutlicher Vorteil für die Kombinationstherapie im Vergleich zu den Einzeltherapien. Allerdings kam es nach Beendigung der Therapie zu einem erneuten Wachstum der Tumore, was auf eine nur temporäre Effektivität der Therapie hinweist. Im orthotopen Tumormodell stellte sich ein signifikant erhöhtes Überleben sowohl für die Chemotherapie- als auch die Chemoimmuntherapie-Gruppe heraus (s. **Abb. 24**). Bei einer von fünf Mäusen aus der Chemoimmuntherapie-Gruppe kam es zu einer vollständigen Tumorregression, die über den gesamten Beobachtungszeitraum anhielt. Dies führte jedoch auf Grund der niedrigen Fallzahlen in den Gruppen zu keinem statistisch signifikanten Unterschied bezüglich des Überlebens nach Chemotherapie bzw. Chemoimmuntherapie.

Für zukünftige Untersuchungen sollte der optimale Zeitpunkt für die ppp-TGF $\beta$ -Injektion in Hinblick auf die Gabe von Gemcitabin evaluiert werden, um den bestmöglichen Effekt aus TGF $\beta$ -Hemmung, Immunaktivierung und Tumorzellapoptose hervorzurufen. Denkbar wären sequenzielle Gemcitabingaben ein paar Stunden vor der Injektion von ppp-TGF $\beta$ , um die Tumorzellen für die RIG-I-vermittelte Apoptose zu sensibilisieren. Zudem wären *in vivo* Untersuchungen mit unterschiedlichem Gemcitabin- bzw. RNA-Konzentrationen wünschenswert, um den *in vitro* beobachteten synergistischen Effekt herauszuarbeiten.

#### 4.9. Zusammenfassende Bewertung der Ergebnisse und Ausblick

In diesem Projekt wurden Zytostatika, die bereits in der Therapie des Pankreaskarzinoms etabliert sind, mit einer bifunktionellen siRNA, die Genexpressionshemmung des immunsuppressiven Zytokins TGF $\beta_1$  mit ppp-RNA-vermittelter RIG-I Aktivierung in einem Molekül vereint, als Chemoimmuntherapie kombiniert. Ziel dieser therapeutischen Strategie war einerseits eine Durchbrechung der Tumor-vermittelten Immunsuppression zu schaffen, andererseits die Induktion von Apoptose in den Tumorzellen zu verstärken. Die Untersuchungen ergaben, dass Gemcitabin hierfür der ideale Partner sein könnte, da es zu einer Hochregulation des pro-apoptotischen Proteins Puma führt, welches eine wichtige Rolle im RIG-I-vermittelten Apoptoseweg spielt. Interessanterweise handelt es sich hierbei um eine selektive Funktion von Gemcitabin, denn 5-FU oder Oxaliplatin hatten keinen additiven Effekt bezüglich Apoptoseinduktion bzw. Puma-Expression.

Neben der Apoptoseinduktion resultiert die Hemmung der TGF $\beta_1$  Produktion in einer Förderung immunologischer und nicht-immunologischer Effekte gegen die Tumorzellen (Ellermeier, Wei et al. 2013). Die ausgeprägte Stromabildung im Pankreaskarzinom stellt ein besonderes therapeutisches Problem dar, da das Stroma als Schutzschild um die Tumorzellen diese von der Wirkung jeglicher Therapien abzuschirmen vermag (Neesse, Michl et al. 2011). Einerseits fördert TGF $\beta$  die Bildung von Tumorstroma (Lohr, Schmidt et al. 2001) und somit könnte die Hemmung der TGF $\beta$  Produktion mittels siRNA den fibrotischen Prozessen im Tumorgewebe gegenwirken. Andererseits könnte eine vermehrte Aktivierung von Immunzellen das Stroma „löchrig“ machen und somit zu erhöhten Konzentrationen von Gemcitabin im Tumorgewebe führen. Diese Hypothese müsste in einem geeigneten Tumormodell, wie zum Beispiel dem KPC-Modell, überprüft werden, welches sich durch eine spontane Tumorbildung im Pankreas und exzessive Stromabildung auszeichnet (Hingorani, Wang et al. 2005;

Bardeesy, Aguirre et al. 2006). Weiterhin könnten Gemcitabin und RIG-I Aktivierung zu einem immunogenen Tumorzelltod führen und DC in Tumor-drainierenden Lymphknoten aktivieren, wodurch eine adaptive Immunantwort gegen die Tumorzellen gefördert würde. So führt eine Behandlung mit ppp-RNA zu einer verbesserten Antigenaufnahme durch DC, sowie zu einer effektiven Aktivierung antigenspezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Ferner werden die Tumorzellen gegenüber einer CTL-vermittelten Zellyse sensitiviert (Düewell et al., Manuskript eingereicht).

Doch wie könnte eine solche Chemoimmuntherapie zukünftig Einzug in die klinische Anwendung finden? Einerseits ist es erforderlich ppp-siRNA in ausreichender Menge und unter kontrollierten GMP-Bedingungen herzustellen, um Patienten in Phase-I/II Studien behandeln zu können. Denkbar wäre eine adjuvante Therapie, die sich in der Regel durch eine geringe residuale Tumorlast und damit verbundener Immunsuppression auszeichnet. Für eine geeignete Patientenselektion wären prädiktive Marker wünschenswert, mit denen sich ein Therapieerfolg voraussagen lässt. Die Ergebnisse aus den *in vitro* Experimenten mit humanen Pankreaskarzinomzellen lassen schließen, dass nicht jeder Tumor für eine solche Therapie gleichermaßen geeignet ist. Eine individuelle Charakterisierung der Tumorzellen bezüglich ihrer Expression von pro- und anti-apoptotischen Proteinen der Bcl2 Familie könnte möglicherweise ein Ansprechen auf die Chemoimmuntherapie vorhersagen. Ferner könnten *in vivo* Experimente mit Pankreastumoren, die aus Biopsien oder Operationspräparaten stammen und in sogenannte humanisierte Mäusen implantiert werden, dienlich sein, um die potenzielle Effektivität der Chemoimmuntherapie *in vivo* im Vorfeld einer Therapie auszutesten.

Zusammengefasst ergeben sich mit RIG-I als Zielstruktur für die Immuntherapie des Pankreaskarzinoms neue vielversprechende Möglichkeiten, die vom Tumor ausgehende Immunsuppression zu durchbrechen. Mit Hilfe der bifunktionellen siRNA ppp-TGFβ kann sowohl eine RIG-I Aktivierung als auch die Expressionshemmung von TGFβ<sub>1</sub> erreicht werden. In Kombination mit dem Chemotherapeutikum Gemcitabin, welches in der Therapie des Pankreaskarzinoms bereits etabliert ist, können insbesondere die Effekte auf die Apoptoseinduktion verstärkt werden, während die RIG-I-vermittelte Immunaktivierung weitgehend erhalten bleibt. Eine solche Kombinationstherapie könnte Resistenzen gegenüber den einzelnen Medikamenten vorbeugen, sowie ggf. durch Dosisreduktion unerwünschte Nebenwirkung der Chemotherapie reduzieren (Vacchelli, Prada et al. 2013). Eine Kombination aus siRNA-basierter Immuntherapie gegen TGFβ<sub>1</sub> und Gemcitabin stellt somit einen

innovativen Ansatz in der Behandlung des Pankreaskarzinoms dar, der es verdient in weiteren präklinischen Modellen evaluiert und optimiert zu werden.

## 5. Zusammenfassung

Das Pankreaskarzinom ist eine äußerst aggressive Krebserkrankung, die mit einer 5-Jahresüberlebensrate von nur 5 % eine extrem schlechte Prognose für die betroffenen Patienten aufweist. Die Chemotherapie mit dem Cytidinanalogon Gemcitabin ist trotz geringer Wirksamkeit bezüglich des Überlebens die derzeitige Standardtherapie.

Unsere Arbeitsgruppe konnte die zytosolische Helikase RIG-I (*retinoic acid-inducible gene 1*) als Zielstruktur für die Therapie des Pankreaskarzinoms identifizieren. RIG-I löst neben einer antiviralen Immunantwort auch Apoptose in Tumorzellen aus. Als synthetischen Liganden von RIG-I wurde eine bifunktionelle siRNA, eine 5'-Triphosphat-modifizierte RNA, die zusätzlich eine *silencing*-Komponente gegen das vom Tumor sezernierte, immunsuppressive Molekül TGF $\beta_1$  trägt (ppp-TGF $\beta$ ) verwendet.

Die Behandlung von murinen Panc02 Pankreastumorzellen mit einer Kombination von ppp-TGF $\beta$  mit Gemcitabin resultierte in einer deutlich verstärkten Apoptoserate im Vergleich zu den Einzelbehandlungen. Hingegen hatte eine Kombination von ppp-TGF $\beta$  mit 5-FU oder Oxaliplatin keinen zusätzlichen Einfluss auf die Apoptoserate der Tumorzellen. Expressionsanalysen auf mRNA- und Proteinebene zeigten, dass durch Gemcitabin, aber nicht durch 5-FU oder Oxaliplatin, die pro-apoptotischen Moleküle Puma und Noxa hochreguliert wurden. Der gleiche Effekt konnte auch in humanen Pankreaskarzinomlinien wie z.B. Suit007 gezeigt werden, die sensitiv gegenüber einer Behandlung mit Gemcitabin sind. Hingegen reagierte die bekanntermaßen Gemcitabin-resistente, humane Linie PANC-1 nicht mit einer Hochregulation von Puma und Noxa. Die Effektivität einer Chemoimmuntherapie wurde *in vivo* in einem C57BL/6-Mausmodell untersucht: Das Wachstum von syngen Panc02 Tumoren war deutlich verlangsamt in den Gruppen, die eine Kombination von ppp-TGF $\beta$  mit Gemcitabin erhielten.

Eine Chemoimmuntherapie mit bifunktioneller siRNA gegen TGF $\beta_1$  und dem Chemotherapeutikum Gemcitabin stellt somit eine innovative Therapieoption des Pankreaskarzinoms dar.

**6. Literaturverzeichnis**

- Adler, G., T. Seufferlein, et al. (2007). "[S3-Guidelines "Exocrine pancreatic cancer" 2007]." *Z Gastroenterol* **45**(6): 487-523.
- Akira, S., S. Uematsu, et al. (2006). "Pathogen recognition and innate immunity." *Cell* **124**(4): 783-801.
- Anz, D., W. Mueller, et al. (2011). "CD103 is a hallmark of tumor-infiltrating regulatory T cells." *Int J Cancer* **129**(10): 2417-2426.
- Apetoh, L., F. Ghiringhelli, et al. (2007). "Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy." *Nat Med* **13**(9): 1050-1059.
- Bardeesy, N., A. J. Aguirre, et al. (2006). "Both p16(Ink4a) and the p19(Arf)-p53 pathway constrain progression of pancreatic adenocarcinoma in the mouse." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(15): 5947-5952.
- Bauer, C., F. Bauernfeind, et al. (2007). "Dendritic cell-based vaccination combined with gemcitabine increases survival in a murine pancreatic carcinoma model." *Gut* **56**(9): 1275-1282.
- Bauer, C., M. Dauer, et al. (2011). "Dendritic cell-based vaccination of patients with advanced pancreatic carcinoma: results of a pilot study." *Cancer Immunol Immunother* **60**(8): 1097-1107.
- Bayne, L. J., G. L. Beatty, et al. (2012). "Tumor-derived granulocyte-macrophage colony-stimulating factor regulates myeloid inflammation and T cell immunity in pancreatic cancer." *Cancer Cell* **21**(6): 822-835.
- Bernstein, E., A. A. Caudy, et al. (2001). "Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference." *Nature* **409**(6818): 363-366.
- Besch, R., H. Poeck, et al. (2009). "Proapoptotic signaling induced by RIG-I and MDA-5 results in type I interferon-independent apoptosis in human melanoma cells." *J Clin Invest* **119**(8): 2399-2411.
- Burris, H. A., 3rd, M. J. Moore, et al. (1997). "Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial." *J Clin Oncol* **15**(6): 2403-2413.
- Cappello, P., S. Rolla, et al. (2013). "Vaccination with ENO1 DNA prolongs survival of genetically engineered mice with pancreatic cancer." *Gastroenterology* **144**(5): 1098-1106.
- Chattopadhyay, S., J. T. Marques, et al. (2010). "Viral apoptosis is induced by IRF-3-mediated activation of Bax." *EMBO J* **29**(10): 1762-1773.
- Chen, Z. H., H. Zhang, et al. (1996). "Gene deletion chemoselectivity: codeletion of the genes for p16(INK4), methylthioadenosine phosphorylase, and the alpha- and

- beta-interferons in human pancreatic cell carcinoma lines and its implications for chemotherapy.* " Cancer Res **56**(5): 1083-1090.
- Clark, C. E., S. R. Hingorani, et al. (2007). "Dynamics of the immune reaction to pancreatic cancer from inception to invasion." Cancer Res **67**(19): 9518-9527.
- Conroy, T., F. Desseigne, et al. (2011). "FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer." N Engl J Med **364**(19): 1817-1825.
- Correale, P., M. T. Del Vecchio, et al. (2005). "5-fluorouracil-based chemotherapy enhances the antitumor activity of a thymidylate synthase-directed polypeptidic peptide vaccine." J Natl Cancer Inst **97**(19): 1437-1445.
- Cui, X. F., T. Imaizumi, et al. (2004). "Retinoic acid-inducible gene-I is induced by interferon-gamma and regulates the expression of interferon-gamma stimulated gene 15 in MCF-7 cells." Biochem Cell Biol **82**(3): 401-405.
- Dauer, M., J. Hertel, et al. (2005). "Chemosensitization of pancreatic carcinoma cells to enhance T cell-mediated cytotoxicity induced by tumor lysate-pulsed dendritic cells." J Immunother **28**(4): 332-342.
- Devito, N. C. and M. W. Saif (2013). "Advances in immunotherapy for pancreatic cancer: 2013." JOP **14**(4): 347-353.
- Dodson, L. F., W. G. Hawkins, et al. (2011). "Potential targets for pancreatic cancer immunotherapeutics." Immunotherapy **3**(4): 517-537.
- Dufour, J. H., M. Dziejman, et al. (2002). "IFN-gamma-inducible protein 10 (IP-10; CXCL10)-deficient mice reveal a role for IP-10 in effector T cell generation and trafficking." J Immunol **168**(7): 3195-3204.
- Dunn, G. P., A. T. Bruce, et al. (2002). "Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape." Nat Immunol **3**(11): 991-998.
- Dunn, G. P., A. T. Bruce, et al. (2005). "A critical function for type I interferons in cancer immunoediting." Nat Immunol **6**(7): 722-729.
- Dunn, G. P., L. J. Old, et al. (2004). "The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting." Immunity **21**(2): 137-148.
- Dunn, G. P., L. J. Old, et al. (2004). "The three Es of cancer immunoediting." Annu Rev Immunol **22**: 329-360.
- Ellermeier, J., J. Wei, et al. (2013). "Therapeutic efficacy of bifunctional siRNA combining TGF-beta1 silencing with RIG-I activation in pancreatic cancer." Cancer Res **73**(6): 1709-1720.
- Friess, H., Y. Yamanaka, et al. (1993). "Enhanced expression of transforming growth factor beta isoforms in pancreatic cancer correlates with decreased survival." Gastroenterology **105**(6): 1846-1856.

- Fukunaga, A., M. Miyamoto, et al. (2004). "CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes together with CD4+ tumor-infiltrating lymphocytes and dendritic cells improve the prognosis of patients with pancreatic adenocarcinoma." *Pancreas* **28**(1): e26-31.
- Gabrilovich, D. I. (2007). "Combination of chemotherapy and immunotherapy for cancer: a paradigm revisited." *Lancet Oncol* **8**(1): 2-3.
- Galetto, A., S. Buttiglieri, et al. (2003). "Drug- and cell-mediated antitumor cytotoxicities modulate cross-presentation of tumor antigens by myeloid dendritic cells." *Anticancer Drugs* **14**(10): 833-843.
- Gaspar, N. J., L. Li, et al. (2007). "Inhibition of transforming growth factor beta signaling reduces pancreatic adenocarcinoma growth and invasiveness." *Mol Pharmacol* **72**(1): 152-161.
- Giam, M., D. C. Huang, et al. (2008). "BH3-only proteins and their roles in programmed cell death." *Oncogene* **27 Suppl 1**: S128-136.
- Green, D. R., T. Ferguson, et al. (2009). "Immunogenic and tolerogenic cell death." *Nat Rev Immunol* **9**(5): 353-363.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2011). "Hallmarks of cancer: the next generation." *Cell* **144**(5): 646-674.
- Hingorani, S. R., E. F. Petricoin, et al. (2003). "Preinvasive and invasive ductal pancreatic cancer and its early detection in the mouse." *Cancer Cell* **4**(6): 437-450.
- Hingorani, S. R., L. Wang, et al. (2005). "Trp53R172H and KrasG12D cooperate to promote chromosomal instability and widely metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma in mice." *Cancer Cell* **7**(5): 469-483.
- Hiraoka, N., K. Onozato, et al. (2006). "Prevalence of FOXP3+ regulatory T cells increases during the progression of pancreatic ductal adenocarcinoma and its premalignant lesions." *Clin Cancer Res* **12**(18): 5423-5434.
- Hornung, V., J. Ellegast, et al. (2006). "5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I." *Science* **314**(5801): 994-997.
- Hruban, R. H., M. Goggins, et al. (2000). "Progression model for pancreatic cancer." *Clin Cancer Res* **6**(8): 2969-2972.
- Hruban, R. H., A. Maitra, et al. (2008). "Update on pancreatic intraepithelial neoplasia." *Int J Clin Exp Pathol* **1**(4): 306-316.
- Hutvagner, G. and M. J. Simard (2008). "Argonaute proteins: key players in RNA silencing." *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**(1): 22-32.



- Jacobs, C., P. Duewell, et al. (2011). "An ISCOM vaccine combined with a TLR9 agonist breaks immune evasion mediated by regulatory T cells in an orthotopic model of pancreatic carcinoma." *Int J Cancer* **128**(4): 897-907.
- Jaschinski, F., T. Rothhammer, et al. (2011). "The antisense oligonucleotide trabedersen (AP 12009) for the targeted inhibition of TGF-beta2." *Curr Pharm Biotechnol* **12**(12): 2203-2213.
- Jinek, M. and J. A. Doudna (2009). "A three-dimensional view of the molecular machinery of RNA interference." *Nature* **457**(7228): 405-412.
- Koido, S., S. Homma, et al. (2011). "Current immunotherapeutic approaches in pancreatic cancer." *Clin Dev Immunol* **2011**: 267539.
- Kubuschok, B., X. Xie, et al. (2004). "Expression of cancer testis antigens in pancreatic carcinoma cell lines, pancreatic adenocarcinoma and chronic pancreatitis." *Int J Cancer* **109**(4): 568-575.
- Le, D. T. and E. M. Jaffee (2012). "Regulatory T-cell modulation using cyclophosphamide in vaccine approaches: a current perspective." *Cancer Res* **72**(14): 3439-3444.
- Li, D., K. Xie, et al. (2004). "Pancreatic cancer." *Lancet* **363**(9414): 1049-1057.
- Lin, Y., S. Kikuchi, et al. (2006). "Serum transforming growth factor-beta1 levels and pancreatic cancer risk: a nested case-control study (Japan)." *Cancer Causes Control* **17**(8): 1077-1082.
- Liyanage, U. K., T. T. Moore, et al. (2002). "Prevalence of regulatory T cells is increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreas or breast adenocarcinoma." *J Immunol* **169**(5): 2756-2761.
- Lohr, M., C. Schmidt, et al. (2001). "Transforming growth factor-beta1 induces desmoplasia in an experimental model of human pancreatic carcinoma." *Cancer Res* **61**(2): 550-555.
- Louvet, C., R. Labianca, et al. (2005). "Gemcitabine in combination with oxaliplatin compared with gemcitabine alone in locally advanced or metastatic pancreatic cancer: results of a GERCOR and GISCAD phase III trial." *J Clin Oncol* **23**(15): 3509-3516.
- Maraskovsky, E., S. Sjolander, et al. (2004). "NY-ESO-1 protein formulated in ISCOMATRIX adjuvant is a potent anticancer vaccine inducing both humoral and CD8+ t-cell-mediated immunity and protection against NY-ESO-1+ tumors." *Clin Cancer Res* **10**(8): 2879-2890.
- Massague, J. (2008). "TGFbeta in Cancer." *Cell* **134**(2): 215-230.

- Melisi, D., S. Ishiyama, et al. (2008). "LY2109761, a novel transforming growth factor beta receptor type I and type II dual inhibitor, as a therapeutic approach to suppressing pancreatic cancer metastasis." *Mol Cancer Ther* **7**(4): 829-840.
- Menard, C., F. Martin, et al. (2008). "Cancer chemotherapy: not only a direct cytotoxic effect, but also an adjuvant for antitumor immunity." *Cancer Immunol Immunother* **57**(11): 1579-1587.
- Meng, G., M. Xia, et al. (2013). "Multifunctional antitumor molecule 5'-triphosphate siRNA combining glutaminase silencing and RIG-I activation." *Int J Cancer*.
- Miyazawa, M., R. Ohsawa, et al. (2010). "Phase I clinical trial using peptide vaccine for human vascular endothelial growth factor receptor 2 in combination with gemcitabine for patients with advanced pancreatic cancer." *Cancer Sci* **101**(2): 433-439.
- Moore, M. J., D. Goldstein, et al. (2007). "Erlotinib plus gemcitabine compared with gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic cancer: a phase III trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group." *J Clin Oncol* **25**(15): 1960-1966.
- Moutsopoulos, N. M., J. Wen, et al. (2008). "TGF-beta and tumors--an ill-fated alliance." *Curr Opin Immunol* **20**(2): 234-240.
- Neesse, A., P. Michl, et al. (2011). "Stromal biology and therapy in pancreatic cancer." *Gut* **60**(6): 861-868.
- North, R. J. (1982). "Cyclophosphamide-facilitated adoptive immunotherapy of an established tumor depends on elimination of tumor-induced suppressor T cells." *J Exp Med* **155**(4): 1063-1074.
- Nowak, A. K., B. W. Robinson, et al. (2003). "Synergy between chemotherapy and immunotherapy in the treatment of established murine solid tumors." *Cancer Res* **63**(15): 4490-4496.
- Pennison, M. and B. Pasche (2007). "Targeting transforming growth factor-beta signaling." *Curr Opin Oncol* **19**(6): 579-585.
- Pichlmair, A., O. Schulz, et al. (2006). "RIG-I-mediated antiviral responses to single-stranded RNA bearing 5'-phosphates." *Science* **314**(5801): 997-1001.
- Plate, J. M., A. E. Plate, et al. (2005). "Effect of gemcitabine on immune cells in subjects with adenocarcinoma of the pancreas." *Cancer Immunol Immunother* **54**(9): 915-925.
- Poeck, H., R. Besch, et al. (2008). "5'-Triphosphate-siRNA: turning gene silencing and RIG-I activation against melanoma." *Nat Med* **14**(11): 1256-1263.
- Pollard, J. W. (2004). "Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis." *Nat Rev Cancer* **4**(1): 71-78.

- Pylyayeva-Gupta, Y., K. E. Lee, et al. (2012). "Oncogenic Kras-induced GM-CSF production promotes the development of pancreatic neoplasia." Cancer Cell **21**(6): 836-847.
- Rabinovich, G. A., D. Gabrilovich, et al. (2007). "Immunosuppressive strategies that are mediated by tumor cells." Annu Rev Immunol **25**: 267-296.
- Raimondi, S., P. Maisonneuve, et al. (2009). "Epidemiology of pancreatic cancer: an overview." Nat Rev Gastroenterol Hepatol **6**(12): 699-708.
- Ramakrishnan, R., D. Assudani, et al. (2010). "Chemotherapy enhances tumor cell susceptibility to CTL-mediated killing during cancer immunotherapy in mice." J Clin Invest **120**(4): 1111-1124.
- Ramakrishnan, R. and D. I. Gabrilovich (2013). "Novel mechanism of synergistic effects of conventional chemotherapy and immune therapy of cancer." Cancer Immunol Immunother **62**(3): 405-410.
- Reynolds, A., D. Leake, et al. (2004). "Rational siRNA design for RNA interference." Nat Biotechnol **22**(3): 326-330.
- Saif, M. W. (2013). "Advancements in the management of pancreatic cancer: 2013." JOP **14**(2): 112-118.
- Scarpa, A., P. Capelli, et al. (1993). "Pancreatic adenocarcinomas frequently show p53 gene mutations." Am J Pathol **142**(5): 1534-1543.
- Schlingensiepen, K. H., F. Jaschinski, et al. (2011). "Transforming growth factor-beta 2 gene silencing with trabedersen (AP 12009) in pancreatic cancer." Cancer Sci **102**(6): 1193-1200.
- Schmitz-Winnenthal, F. H., L. V. Galindo-Escobedo, et al. (2007). "Potential target antigens for immunotherapy in human pancreatic cancer." Cancer Lett **252**(2): 290-298.
- Schmitz-Winnenthal, F. H., C. Volk, et al. (2005). "High frequencies of functional tumor-reactive T cells in bone marrow and blood of pancreatic cancer patients." Cancer Res **65**(21): 10079-10087.
- Schnurr, M., Q. Chen, et al. (2005). "Tumor antigen processing and presentation depend critically on dendritic cell type and the mode of antigen delivery." Blood **105**(6): 2465-2472.
- Schnurr, M., P. Galambos, et al. (2001). "Tumor cell lysate-pulsed human dendritic cells induce a T-cell response against pancreatic carcinoma cells: an in vitro model for the assessment of tumor vaccines." Cancer Res **61**(17): 6445-6450.
- Schreiber, R. D., L. J. Old, et al. (2011). "Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion." Science **331**(6024): 1565-1570.

- Serafini, P., I. Borrello, et al. (2006). "Myeloid suppressor cells in cancer: recruitment, phenotype, properties, and mechanisms of immune suppression." Semin Cancer Biol **16**(1): 53-65.
- Sheikh, R., N. Walsh, et al. (2010). "Challenges of drug resistance in the management of pancreatic cancer." Expert Rev Anticancer Ther **10**(10): 1647-1661.
- Siegel, R., D. Naishadham, et al. (2012). "Cancer statistics, 2012." CA Cancer J Clin **62**(1): 10-29.
- Siveke, J. T., H. Einwachter, et al. (2007). "Concomitant pancreatic activation of Kras(G12D) and Tgfa results in cystic papillary neoplasms reminiscent of human IPMN." Cancer Cell **12**(3): 266-279.
- Suzuki, E., V. Kapoor, et al. (2005). "Gemcitabine selectively eliminates splenic Gr-1+CD11b+ myeloid suppressor cells in tumor-bearing animals and enhances antitumor immune activity." Clin Cancer Res **11**(18): 6713-6721.
- Takeuchi, O. and S. Akira (2008). "MDA5/RIG-I and virus recognition." Curr Opin Immunol **20**(1): 17-22.
- Tanaka, F., H. Yamaguchi, et al. (2002). "Intratumoral injection of dendritic cells after treatment of anticancer drugs induces tumor-specific antitumor effect in vivo." Int J Cancer **101**(3): 265-269.
- Tesniere, A., F. Schlemmer, et al. (2010). "Immunogenic death of colon cancer cells treated with oxaliplatin." Oncogene **29**(4): 482-491.
- Tormo, D., A. Checinska, et al. (2009). "Targeted activation of innate immunity for therapeutic induction of autophagy and apoptosis in melanoma cells." Cancer Cell **16**(2): 103-114.
- Uslu, R., N. Borsellino, et al. (1997). "Chemosensitization of human prostate carcinoma cell lines to anti-fas-mediated cytotoxicity and apoptosis." Clin Cancer Res **3**(6): 963-972.
- Vacchelli, E., N. Prada, et al. (2013). "Current trends of anticancer immunochemotherapy." Oncoimmunology **2**(6): e25396.
- Vesely, M. D., M. H. Kershaw, et al. (2011). "Natural innate and adaptive immunity to cancer." Annu Rev Immunol **29**: 235-271.
- Vincent, J., G. Mignot, et al. (2010). "5-Fluorouracil selectively kills tumor-associated myeloid-derived suppressor cells resulting in enhanced T cell-dependent antitumor immunity." Cancer Res **70**(8): 3052-3061.
- von Bernstorff, W., M. Voss, et al. (2001). "Systemic and local immunosuppression in pancreatic cancer patients." Clin Cancer Res **7**(3 Suppl): 925s-932s.
- Von Hoff, D. D., T. Ervin, et al. (2013). "Increased survival in pancreatic cancer with nab-paclitaxel plus gemcitabine." N Engl J Med **369**(18): 1691-1703.

- Wagner, M., C. Redaelli, et al. (2004). "Curative resection is the single most important factor determining outcome in patients with pancreatic adenocarcinoma." *Br J Surg* **91**(5): 586-594.
- Wong, H. H. and N. R. Lemoine (2009). "Pancreatic cancer: molecular pathogenesis and new therapeutic targets." *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **6**(7): 412-422.
- Yang, L., Y. Pang, et al. (2010). "TGF-beta and immune cells: an important regulatory axis in the tumor microenvironment and progression." *Trends Immunol* **31**(6): 220-227.
- Yoneyama, M. and T. Fujita (2009). "RNA recognition and signal transduction by RIG-I-like receptors." *Immunol Rev* **227**(1): 54-65.
- Yoneyama, M., M. Kikuchi, et al. (2005). "Shared and unique functions of the DExD/H-box helicases RIG-I, MDA5, and LGP2 in antiviral innate immunity." *J Immunol* **175**(5): 2851-2858.
- Zheng, L., J. Xue, et al. (2013). "Role of immune cells and immune-based therapies in pancreatitis and pancreatic ductal adenocarcinoma." *Gastroenterology* **144**(6): 1230-1240.
- Zitvogel, L., L. Apetoh, et al. (2008). "Immunological aspects of cancer chemotherapy." *Nat Rev Immunol* **8**(1): 59-73.
- Zitvogel, L. and G. Kroemer (2009). "Anticancer immunochemotherapy using adjuvants with direct cytotoxic effects." *J Clin Invest* **119**(8): 2127-2130.
- Zitvogel, L., A. Tesniere, et al. (2006). "Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion." *Nat Rev Immunol* **6**(10): 715-727.
- Zoglmeier, C., H. Bauer, et al. (2011). "CpG blocks immunosuppression by myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice." *Clin Cancer Res* **17**(7): 1765-1775.

**7. Verzeichnis der Abkürzungen**

APC	Allophycocyanin
ASCO	<i>American Society of Clinical Oncology</i>
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CFSE	<i>carboxyfluorescein succinimidyl ester</i>
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CTA	<i>cancer testis antigen</i>
CTL	zytotoxische T-Zellen (CD8 <sup>+</sup> )
CXCL10	<i>C-X-C motif chemokine 10</i> (Synonym: IP-10)
DC	dendritische Zelle
DMEM	<i>dulbecco's modified eagle medium</i>
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
EDTA	Ethylendiamin-tetraacetat
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FACS	<i>fluorescent-activated cell sorter</i>
FBS	<i>fetal bovine serum</i>
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
GM-CSF	<i>granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
HSP	<i>heat shock</i> Protein
hTGFβ	humanes TGFβ
IFNα	Interferon alpha
IFNβ	Interferon beta
IL-6	Interleukin 6
IL-10	Interleukin 10
i.p.	intraperitoneal

## Verzeichnis der Abkürzungen

---

IP-10	<i>interferon gamma-induced protein 10</i>
IPS-1	<i>interferon-beta promoter stimulator 1</i> (Syn.: MAVS, VISA; Cardif)
i.v.	intravenös
IRF-3; IRF-7	<i>interferon regulatory factor -3, -7</i>
MHC-I	<i>major histocompatibility complex I</i>
MDA5	<i>melanoma differentiation-associated antigen 5</i>
MDSC	<i>myeloid-derived suppressor cell</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
mTGF $\beta$	Maus- TGF $\beta$
NF $\kappa$ B	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated b-cells</i>
NK	natürliche Killerzelle
Opti-MEM®	<i>minimal essential medium</i>
PanIN	<i>pancreatic intraepithelial neoplasia</i>
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cell</i>
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PI	Propidiumjodid
poly(I:C)	<i>polyinosinic-polycytidylic acid</i>
ppp-siRNA	5'-Triphosphat-siRNA
qRT-PCR	<i>quantitative real time- polymerase chain reaction</i>
RIG-I	<i>retinoic acid-inducible gene I</i>
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RLH	<i>RIG-I-like-Helikase</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
TAMs	Tumor-assoziierte Makrophagen
TGF $\beta$	<i>transforming growth factor beta</i>
TGF $\beta_1$	<i>transforming growth factor beta 1</i>
TLR	<i>toll-like-Rezeptoren</i>
TRIS	Tris-aminomethan

Verzeichnis der Abkürzungen

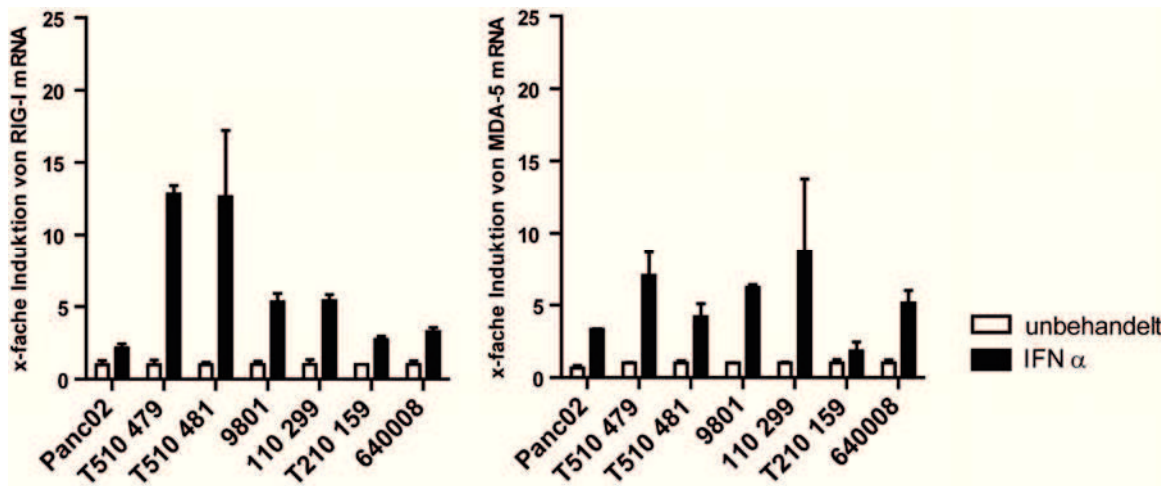
---

Typ-I-IFN	Typ I Interferone (Interferon $\alpha$ / $\beta$ )
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
5-FU	5-Fluoruracil



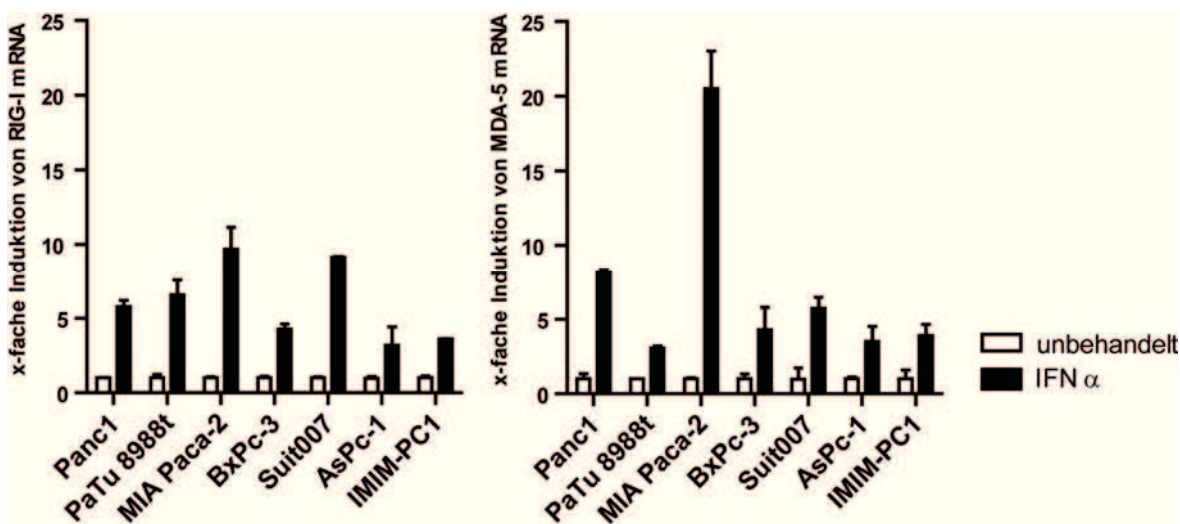
## 8. Anhang

### 8.1. Expression von RIG-I und MDA5 in verschiedenen murinen und humanen Pankreaskarzinomzelllinien



**Abbildung 51: Induktion von RIG-I und MDA5 Expression durch Typ I Interferon in murinen Pankreaskarzinom Zelllinien.**

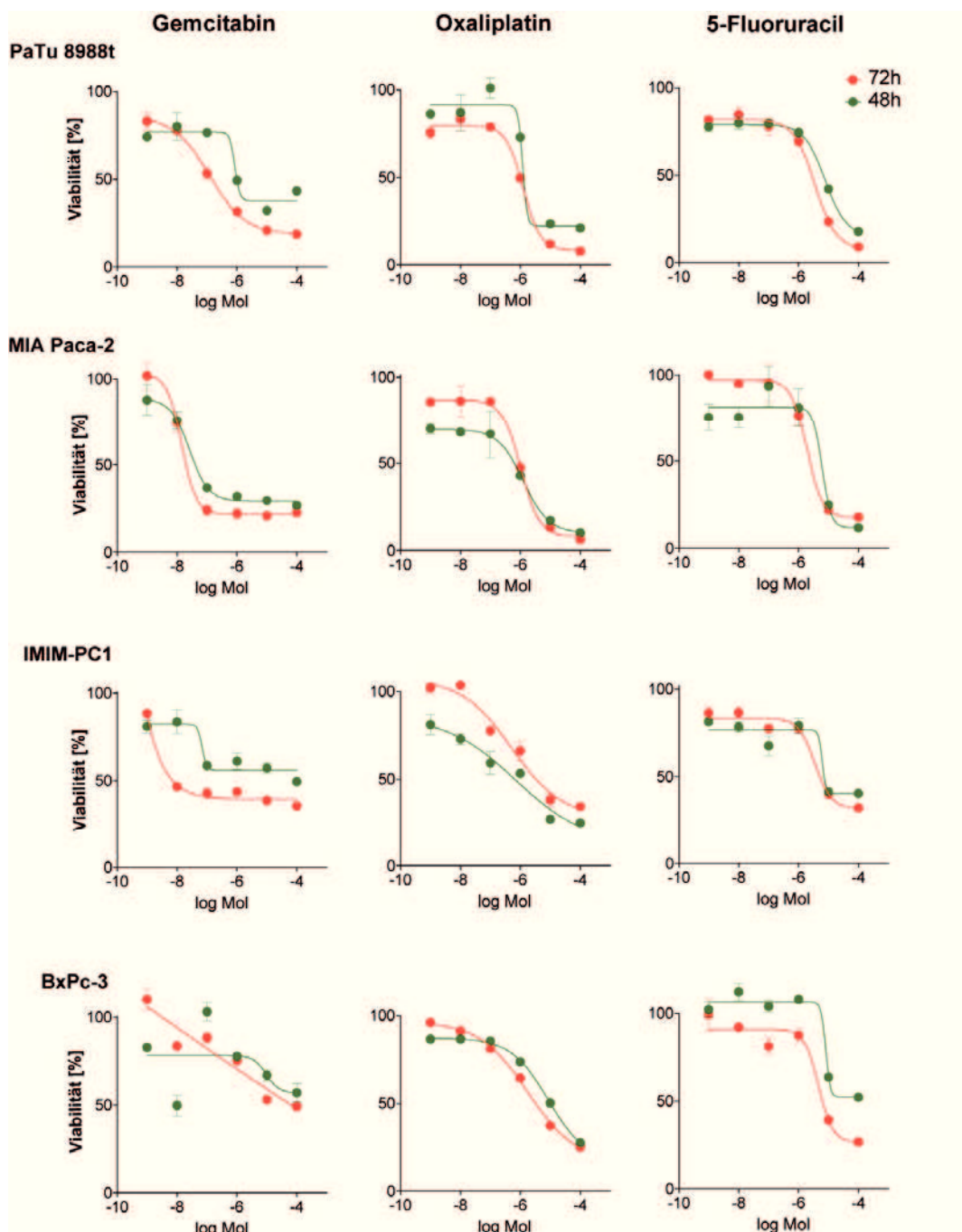
Diverse murine Pankreaskarzinomzelllinien (Panc02 und Zelllinien, die aus spontanen Pankreastumoren in Mäusen mit Mutationen im Kras und p53 Gen generiert wurden) wurden mit murinem rekombinantem IFN $\alpha$  behandelt und nach 18 h die relative Menge an RIG-I bzw. MDA5 mRNA mittels qRT-PCR gemessen (normiert auf die unbehandelte Kontrolle). Gezeigt sind Mittelwerte + S.D. aus jeweils zwei Proben.



**Abbildung 52: Induktion von RIG-I und MDA5 Expression durch Typ I Interferon in humanen Pankreaskarzinom Zelllinien.**

Humane Tumorzellen wurden mit humanem rekombinantem IFN $\alpha$  behandelt und nach 18 h die relative Menge an RIG-I bzw. MDA-5 mRNA mittels qRT-PCR gemessen (normiert auf die unbehandelte Kontrolle). Gezeigt sind Mittelwerte + S.D. aus jeweils zwei Proben.

## 8.2. Sensitivität humaner Pankreaskarzinomzelllinien gegenüber Chemotherapie



**Abbildung 53: Sensitivität humaner Pankreaskarzinomzelllinien gegenüber der Chemotherapie Gemcitabin, Oxaliplatin und 5-FU.**

Humane Tumorzellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen von Gemcitabin, Oxaliplatin und 5-FU inkubiert und deren Zellviabilität nach 48 und 72 h mittels *Cell Titer Blue* Assay bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte aus Triplikaten relativ zur unbehandelten Kontrolle.

## 9. Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

Abbildung 1: Strukturformeln der Chemotherapeutika und physiologische Korrelate ....	4
Abbildung 2: Effekte von TGF $\beta$ auf Tumorinvasivität und Zellen des Immunsystems....	7
Abbildung 3: Antivirale Immunantwort nach RIG-I-Aktivierung durch 5'ppp-RNA.....	10
Abbildung 4: Prinzip der RNA-Interferenz.....	11
Abbildung 5: Repräsentative <i>Dot blot</i> Analyse der Annexin V/ PI-Färbung.....	19
Abbildung 6: RIG-I Expression und Regulation in Panc02 Pankreaskarzinomzellen. ...	30
Abbildung 7: siRNA-vermittelte Genexpressions-Hemmung von murinem TGF $\beta_1$ .....	31
Abbildung 8: Immunstimulatorische Effekte durch Transfektion mit ppp-mTGF $\beta$ .....	32
Abbildung 9: Apoptoseinduktion durch Transfektion mit ppp-mTGF $\beta$ . ....	33
Abbildung 10: Sensitivität von Panc02 Zellen gegenüber Chemotherapeutika. ....	34
Abbildung 11: Apoptoseinduktion von Panc02 Zellen durch RNA-basierte Chemoimmuntherapie. ....	35
Abbildung 12: Anstieg der Apoptoserate bei kombinierter Gabe von ppp-mTGF $\beta$ und Chemotherapeutika. ....	36
Abbildung 13: Apoptoseinduktion von Panc02 Zellen im suboptimalen Wirkungsbereich von Gemcitabin.....	37
Abbildung 14 A: Apoptose von Panc02 Zellen bei RNA-basierter Chemoimmuntherapie. ....	38
Abbildung 14 B: Zeitverlauf der Apoptose von Panc02 Zellen induziert durch RNA- basierte Chemoimmuntherapie.....	38
Abbildung 15: Einfluss der RNA-basierten Chemoimmuntherapie auf die Tumorzellvitalität im <i>Cell Titer Blue</i> Assay.....	39
Abbildung 16: Einfluss von immunaktiver RNA und Chemotherapeutika auf die RIG-I Expression von Panc02 Zellen. ....	40
Abbildung 17: Expression proapoptotischer Proteine in Panc02 Zellen nach Gemcitabin bzw. ppp-mTGF $\beta$ Behandlung.....	41
Abbildung 18: Expression der proapoptotischen Proteine Puma und Noxa nach Behandlung mit ppp-mTGF $\beta$ in Panc02 Zellen.....	42
Abbildung 19: Expression der proapoptotischen Proteine Noxa und Puma in Panc02 Zellen nach Behandlung mit Chemotherapeutika.....	43
Abbildung 20: Expression von Puma in Panc02 Zellen nach Gemcitabin-Therapie....	44
Abbildung 21: RNA-basierte Chemoimmuntherapie im subkutanen Panc02 Modell....	45
Abbildung 22: Wachstumskontrolle in den Therapiegruppen am Tag 22 nach Tumorinduktion.....	45
Abbildung 23: Dosisfindung von Gemcitabin im subkutanen Panc02 Modell.....	46
Abbildung 24: Einfluss der RNA-basierten Chemoimmuntherapie auf das Überleben im orthotopen Panc02 Modell.....	47
Abbildung 25: Übersicht über die durchgeführten Analysen im orthotopen Panc02 Modell. ....	48
Abbildung 26: Analyse der Anzahl und Aktivierung von NK- und NKT-Zellen im peripheren Blut bei der ersten Blutentnahme. ....	49
Abbildung 27: Analyse der Anzahl und Aktivierung von T- und B-Lymphozyten im peripheren Blut bei der ersten Blutentnahme. ....	50
Abbildung 28: Analyse der Anzahl und Aktivierung von NK- und NKT-Zellen im peripheren Blut bei der zweiten Blutentnahme. ....	51

## Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

Abbildung 29: Analyse der Anzahl und Aktivierung von T- und B-Lymphozyten im peripheren Blut bei der zweiten Blutentnahme. ....	52
Abbildung 30: Analyse der Anzahl und Aktivierung der NK- und NKT-Zellen im peripheren Blut bei der dritten Blutentnahme. ....	53
Abbildung 31: Analyse der Anzahl und Aktivierung von T- und B-Lymphozyten im peripheren Blut bei der dritten Blutentnahme. ....	54
Abbildung 32: Einfluss der Therapie auf die CXCL10 Serumspiegel. ....	55
Abbildung 33: Einfluss der Therapie auf die TGF $\beta$ Serumspiegel. ....	55
Abbildung 34: Expression von RIG-I in humanen Pankreaskarzinomlinien. ....	56
Abbildung 35: Genexpressionshemmung von TGF $\beta_1$ in PANC-1 Zellen. ....	57
Abbildung 36: Genexpressionshemmung von TGF $\beta_1$ durch unmodifizierte und 5'-ppp-modifizierte siRNA. ....	58
Abbildung 37: Expression von MHC-I auf PANC-1 Zellen nach Behandlung mit ppp-hTGF $\beta$ . ....	59
Abbildung 38: IFN $\beta$ und CXCL10 Produktion von humanen Pankreaskarzinomzelllinien nach ppp-siRNA Stimulation. ....	60
Abbildung 39: Apoptoseinduktion durch Transfektion mit ppp-hTGF $\beta$ in PANC-1 Zellen. ....	61
Abbildung 40: Apoptoseinduktion durch Transfektion mit ppp-hTGF $\beta$ in Suit007 Zellen. ....	62
Abbildung 41: Sensitivität humaner Pankreaskarzinomzelllinien gegenüber Chemotherapie. ....	63
Abbildung 42: Effekt der RNA-basierten Chemoimmuntherapie auf die Zellviabilität humaner Pankreaskarzinomzellen. ....	64
Abbildung 43: Effekt der kombinierten Therapie mit ppp-hTGF $\beta$ und Zytostatika auf die Apoptoserate humaner Pankreaskarzinomzellen. ....	65
Abbildung 45: Einfluss von Zytostatika auf die RIG-I Expression in PANC-1 und Suit007 Zellen. ....	66
Abbildung 44: Einfluss von ppp-hTGF $\beta$ auf die RIG-I Expression in PANC-1 Zellen. ..	66
Abbildung 46: Induktion pro- und antiapoptotischer Proteine durch Gemcitabin bzw. ppp-hTGF $\beta$ in der humanen Linie PANC-1. ....	67
Abbildung 47: Einfluss von Gemcitabin auf die Expression von Puma und Noxa in humanen Tumorzellen. ....	68
Abbildung 48: Einfluss von 5-FU und Oxaliplatin auf die Puma und Noxa Expression in humanen Tumorzellen. ....	69
Abbildung 49: Expression von Puma und Noxa auf Proteinebene in humanen Suit007 Zellen nach Gabe von Gemcitabin. ....	70
Abbildung 50: Potenzielle Interaktion von Gemcitabin mit dem RIG-I-vermittelten Apoptoseweg. ....	79
Abbildung 51: Induktion von RIG-I und MDA5 Expression durch Typ I Interferon in murinen Pankreaskarzinom Zelllinien. ....	97
Abbildung 52: Induktion von RIG-I und MDA5 Expression durch Typ I Interferon in humanen Pankreaskarzinom Zelllinien. ....	97
Abbildung 53: Sensitivität humaner Pankreaskarzinomzelllinien gegenüber der Chemotherapeutika Gemcitabin, Oxaliplatin und 5-FU. ....	98

## Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

Tabelle 1: Murine Pankreaskarzinomzelllinien .....	15
Tabelle 2: siRNA-Sequenzen .....	16
Tabelle 3: Übersicht über die verwendeten Zytostatika.....	17
Tabelle 4: Sequenzen der DNA-Templates. Die Promotorsequenz ist jeweils hervorgehoben.....	20
Tabelle 5: Pipettieransatz für die qRT-PCR.....	22
Tabelle 6: Primersequenzen für die qRT-PCR .....	23
Tabelle 7: PCR Reaktionsansatz.....	24
Tabelle 8: PCR-Zyklen.....	24
Tabelle 9: Zusammensetzung des Narkotikums.....	26
Tabelle 10: Zusammensetzung des Antidots.....	27
Tabelle 11: Ansatz für die <i>in vivo</i> Injektion .....	28
Tabelle 12: FACS-Antikörper zur Färbung der PBMC.....	29
Tabelle 13: LogEC75 Werte für drei Chemotherapeutika bei Panc02 Zellen. ....	34
Tabelle 14: logEC75 Werte der drei Chemotherapeutika in PANC-1 sowie Suit007 Zellen. ....	63

**10. Danksagung**

Bedanken möchte ich mich bei meiner Arbeitsgruppe unter der Leitung von Prof. Dr. med. Max Schnurr für die langjährige Betreuung. Besonderer Dank gilt Dr. rer. nat. Sabine Hoves und Dr. rer. biol. hum. Peter Düwell, die mir mit Rat und Tat zuverlässig bei Seite gestanden haben. Des Weiteren möchte ich mich bei meinem Mentor PD Dr. rer. hum. biol. Robert Besch bedanken, der zu dieser Arbeit sowohl Ideen als auch Material beigesteuert hat. Für die ideelle Förderung sowie materielle Unterstützung im Rahmen des DFG Graduiertenkollegs 1202 „Oligonukleotide in Zellbiologie und Therapie“ unter der Leitung von Prof. Dr. med. Stefan Endres bin ich sehr dankbar.

Ich danke meiner Familie und meinen Freunden für ihr Vertrauen und ihre emotionale Unterstützung.

**11. Veröffentlichungen****I. Abstracts und Vorträge**

1. **Mareike Stieg**, Sabine Hoves, Peter Düwell, Robert Besch, Stefan Endres und Max Schnurr  
  
siRNA- basierte Chemoimmuntherapie des Pankreaskarzinoms  
  
*2. DoktaMed der LMU, Mai 2010, München (Poster)*
  
2. **Stieg M.**, Hoves S., Düwell P., Ellermeier J., Besch R., Endres S., Schnurr M.  
  
Chemoimmuntherapie des Pankreaskarzinoms mit bifunktioneller siRNA gegen TGF $\beta_1$   
  
*66. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten, 5. Herbsttagung der Deutschen Gesellschaft für Allgemein- und Viszeralchirurgie, September 2011, Leipzig (Poster)*
  
3. **M. Stieg**, S. Hoves, P. Düwell, H. Bourhis, J. Ellermeier, M. Schnurr  
  
Chemoimmuntherapie des Pankreaskarzinoms mit bifunktioneller siRNA gegen TGFbeta  
  
*Deutscher Pankreasclub 2011, November 2011, Marburg (Vortrag)*

**II. Originalarbeiten**

1. Ellermeier J, Wei J, Düwell P, Hoves S, **Stieg MR**, Adunka T, Noerenberg D, Anders HJ, Mayr D, Poeck H, Hartmann G, Endres S, Schnurr M  
  
Therapeutic efficacy of bifunctional siRNA combining TGF- $\beta_1$  silencing with RIG-I activation in pancreatic cancer  
  
*Cancer Res* **73**(6): 1709-1720, 2013

## Eidesstattliche Versicherung

Stieg, Mareike Rita

---

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

**Chemoimmuntherapie des Pankreaskarzinoms:**

**Kombination aus bifunktioneller 5'-Triphosphat-modifizierter siRNA gegen TGF $\beta$ 1 und den Chemotherapeutika Gemcitabin, Oxaliplatin und 5-Fluoruracil**

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

---

Ort, Datum

---

Unterschrift Doktorandin/Doktorand